



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Approcci fisici per lo studio degli effetti  
nella stimolazione dell'attività neuronale

Relatore

Prof.ssa Cinzia Sada

Laureanda

Elena Piccoli

Anno Accademico 2020/2021



## *Abstract*

Nel presente lavoro di tesi si indaga lo stato dell'arte sui metodi e approcci fisici usati per studiare gli effetti nella stimolazione dell'attività neuronale. È noto infatti che i neuroni comunicano tra loro tramite i collegamenti intercellulari definiti sinapsi e la comunicazione sinaptica avviene attraverso sostanze chimiche, dette neurotrasmettitori, che stimolano, tramite il passaggio dell'impulso nervoso, la cellula successiva. L'impulso nervoso, detto anche potenziale d'azione, si propaga lungo la fibra nervosa e determina delle modificazioni sia chimiche sia elettriche. I neuroni sono polarizzati, poiché presentano fuori dalla membrana cellulare una carica elettrica diversa da quella presente all'interno. La differenza di carica è determinata dagli ioni sodio e potassio presenti in percentuali diverse all'interno e all'esterno del neurone; tali ioni permettono, grazie all'ausilio di sistemi chiamati canali ionici, di trasmettere l'informazione lungo la cellula neuronale. Quando il potenziale d'azione raggiunge la sinapsi, le vescicole presenti sulla sua superficie liberano un neurotrasmettitore che si diffonde rapidamente tramite la fibra postsinaptica e si lega ad alcune molecole specifiche della membrana postsinaptica della cellula recettrice. La reazione con il neurotrasmettitore altera la permeabilità della membrana della fibra postsinaptica, dando origine ad un potenziale d'azione che consentirà la propagazione ulteriore dell'impulso nervoso.

La tesi mira ad approfondire gli attuali metodi e approcci, ivi inclusi quelli che impiegano nanotecnologie, ottica e imaging nella prospettiva di individuare ambiti di applicazione, limiti di applicabilità e prospettive future per proporre soluzioni per coprire i gap ad oggi presenti nella comprensione dei meccanismi di stimolazione e il ruolo giocato da ogni parte del neurone.

## *Indice*

1. Introduzione.....	p. 1
2. Struttura del neurone.....	p. 1
2.1 Trasferimento dell'impulso nervoso.....	p. 2
3. Stimolazione dei neuroni.....	p. 4
3.1 Stimolazione elettromagnetica.....	p. 4
3.2 Stimolazione elettrica dei canali di calcio.....	p. 14
3.3 Irradiazione luminosa di cellule neuronali periferiche.....	p. 15
3.4 Punti quantici.....	p. 20
4. Conclusione.....	p. 25
5. Bibliografia.....	p. 27
6. Fonti immagini.....	p. 27

## 1. Introduzione

I neuroni condividono molte proprietà con gli altri tipi di cellule presenti nell'organismo. Possiedono tuttavia anche altre caratteristiche, prima tra tutte la capacità di trasmettere impulsi elettrici, che per certi aspetti li rendono strutture particolarmente interessanti ma anche complesse da studiare. La mole di lavori svolti sulla modulazione dell'attività neuronale è infatti notevole non solo per la varietà dei metodi utilizzati (tra i quali la stimolazione elettromagnetica occupa un ruolo di primo piano), ma anche per i diversi tipi di cellule neuronali studiate (tra cui cellule di Schwann, gangli delle radici dorsali, neuroni dell'ippocampo o dell'ipotalamo per citare alcuni esempi). Gli scopi comuni sono però gli stessi: raggiungere un'alta risoluzione spazio-temporale della sonda usata per monitorare o rivelare il comportamento del neurone, ridurre l'invasività delle procedure e il rischio di danno ai tessuti biologici, far agire in modo selettivo gli apparati. In tal modo si spera di riuscire a curare malattie neurologiche come l'Alzheimer, il morbo di Parkinson e alcuni problemi della retina o dell'udito.

Nel presente lavoro di tesi si è focalizzata l'attenzione su alcuni degli studi svolti, concentrandosi sul meccanismo fisico sottostante, sui risultati ottenuti e sull'effettiva applicabilità agli ambiti di interesse (di ricerca o medico).

Dapprima nel capitolo 2 verrà illustrata la struttura del neurone, con particolare attenzione al processo di trasferimento del potenziale d'azione. In seguito nel capitolo 3 verranno quindi studiati alcuni metodi per eccitare l'attività neuronale: la stimolazione elettromagnetica, tramite radiazione luminosa nel visibile o usando strutture costituite da punti quantici. Infine nel capitolo 4 verranno comparati i risultati ottenuti per stabilire l'ambito e la metodologia più adatta per l'applicazione di ciascuno dei metodi analizzati.

## 2. Struttura del neurone

Il neurone è una cellula particolare adibita all'elaborazione e alla trasmissione degli impulsi nervosi. È formata da tre parti principali:

- il corpo cellulare (chiamato anche soma), contenente il nucleo e gli organuli responsabili delle funzioni cellulari;
- i dendriti, prolungamenti fibrosi che si diramano dal soma e la cui funzione è di ricevere ed elaborare i segnali provenienti da altri neuroni;
- l'assone, di aspetto analogo ai dendriti, differisce da essi in quanto più lungo e adibito a trasportare il segnale attraverso la cellula e trasmetterlo al neurone successivo.

In particolare, per ridurre la dissipazione dell'impulso nervoso l'assone è rivestito da una membrana isolante, la guaina mielinica, composta da cellule gliali (chiamate oligodendrociti nel sistema nervoso centrale e cellule di Schwann nel sistema nervoso periferico). All'estremità dell'assone è presente la sinapsi, una struttura dedicata al trasferimento del segnale ai dendriti della cellula neuronale successiva.

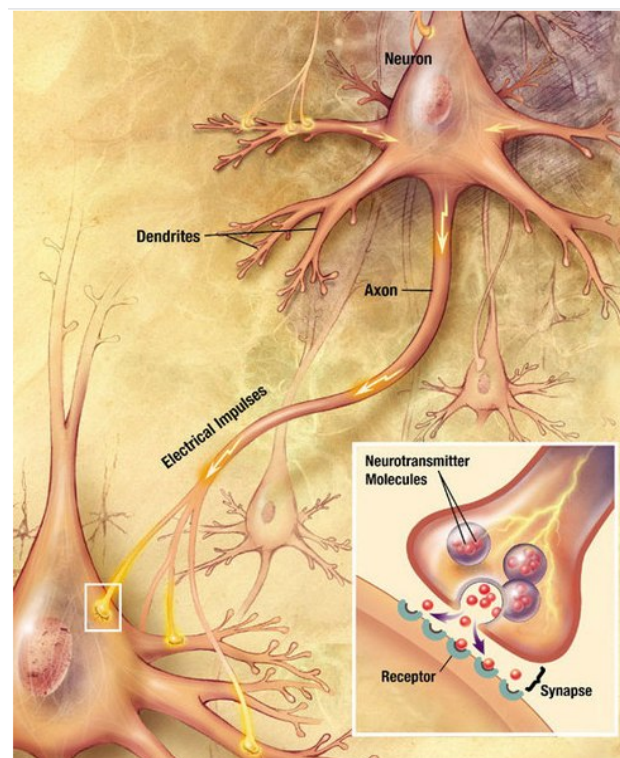


Fig. 1 Schema rappresentativo del neurone.

Esistono due diversi tipi di sinapsi, quelle di tipo chimico e quelle di tipo elettrico. La sinapsi chimica, la

tipologia più diffusa, è formata dai bottoni sinaptici (vescicole contenenti neurotrasmettitori necessari per il trasferimento dell'impulso nervoso), dallo spazio sinaptico e dalla membrana postsinaptica. Nella sinapsi elettrica invece il segnale viene trasmesso direttamente attraverso la giunzione comunicante (o "gap junction") presente, che è di dimensioni molto inferiori rispetto allo spazio sinaptico, tramite i canali ionici (una descrizione più approfondita sarà fornita in seguito).

Per il diverso funzionamento, risulta che le sinapsi elettriche trasmettono l'impulso più velocemente rispetto alle sinapsi chimiche, sebbene l'intensità del segnale diminuisca passando al neurone successivo. Per questo motivo le sinapsi elettriche sono meno efficienti.

A causa della loro natura polare, le molecole d'acqua presenti all'interno o all'esterno della cellula si legano con gli ioni presenti tramite attrazione elettrostatica; in particolare, l'atomo di ossigeno (avendo carica parziale negativa) si lega con i cationi, mentre gli atomi di idrogeno (che hanno carica parziale positiva) si legano con gli anioni. Gli ioni risultano quindi circondati da una nuvola di molecole di acqua e non riescono a passare attraverso la membrana cellulare: questa è infatti composta da un doppio strato fosfolipidico, i cui componenti hanno una testa idrofila e una coda idrofoba, con le code che puntano verso l'esterno della membrana stessa. Affinché avvenga il passaggio degli ioni è dunque necessaria energia per liberare lo ione dalle molecole d'acqua che lo circondano. I canali ionici, proteine complesse presenti sulla membrana cellulare, sono le strutture adibite a tale scopo in quanto presentano un bilancio energetico orientato in modo tale da favorire il flusso degli ioni, che nel caso del neurone sono ioni di sodio  $\text{Na}^+$ , di potassio  $\text{K}^+$  e di calcio  $\text{Ca}^{2+}$ .

Alcuni canali ionici sono "voltage gated", ossia il passaggio degli ioni è possibile solo tramite la variazione della differenza di potenziale presente tra interno ed esterno del neurone. Altri canali ionici sono invece "chemically gated" (anche detti chemi-dipendenti), cioè l'apertura del canale, e quindi il passaggio degli ioni, si ha solo tramite opportune interazioni con le sostanze chimiche presenti all'interno o all'esterno della cellula. Un ulteriore tipo di canali ionici sono le cosiddette pompe ioniche, che determinano il passaggio di ioni tramite stimolazioni meccaniche; in particolare, tale passaggio avviene contro il gradiente di concentrazione ed è quindi necessaria energia, che è fornita dalla cellula stessa.

## *2.1 Trasferimento dell'impulso nervoso*

La caratteristica fondamentale per il trasporto dell'impulso nervoso è la presenza di una differenza di potenziale tra interno ed esterno del neurone, dovuta ad una diversa concentrazione di ioni sodio, potassio e calcio. In particolare, risulta che all'interno della cellula prevalgono cariche negative, mentre all'esterno cariche positive. Con opportune stimolazioni, quindi, si ha nel neurone uno spostamento di ioni corrispondente all'impulso nervoso, chiamato anche potenziale d'azione.

Il processo di trasferimento dell'informazione ha inizio nei dendriti. I neurotrasmettitori (particolari sostanze chimiche) provenienti dal neurone precedente si legano ai canali ionici di sodio chemi-dipendenti presenti, determinando l'apertura del canale stesso; gli ioni di sodio  $\text{Na}^+$  entrano quindi nella cellula variando la differenza di potenziale presente tra interno ed esterno del neurone. Nella fattispecie, risulta che la polarità della membrana viene invertita (quindi l'interno è carico positivamente mentre l'esterno negativamente). Se la cellula raggiunge il livello di soglia, corrispondente ad una differenza di potenziale di circa -55 mV, i canali di sodio adiacenti sono stimolati e si aprono, facendo entrare nel neurone ulteriori ioni  $\text{Na}^+$ , e l'effetto si propaga lungo la membrana. A tal punto la differenza di potenziale presente è di circa +40 mV e si parla di potenziale d'azione. Questa fase iniziale è detta depolarizzazione.

In seguito si ha la cosiddetta ripolarizzazione, durante la quale i canali di sodio si chiudono e si aprono

invece i canali di potassio, con il conseguente passaggio di ioni  $K^+$  verso l'esterno della cellula neuronale. In tal modo viene ripristinata la polarità originaria del neurone, sebbene la differenza di potenziale tra i due lati della membrana sia inferiore del valore a riposo (pari a circa -70 mV).

La fase successiva è detta refrattaria in quanto i canali di sodio non possono essere riaperti e risultano quindi inattivi. È necessario prima che la differenza di potenziale della membrana cellulare sia ripristinata: a tale scopo le pompe sodio-potassio trasferiscono ioni  $Na^+$  all'esterno del neurone e ioni  $K^+$  al suo interno.

Una schematizzazione della trasmissione del potenziale d'azione lungo l'assone è riportata in Fig. 3.

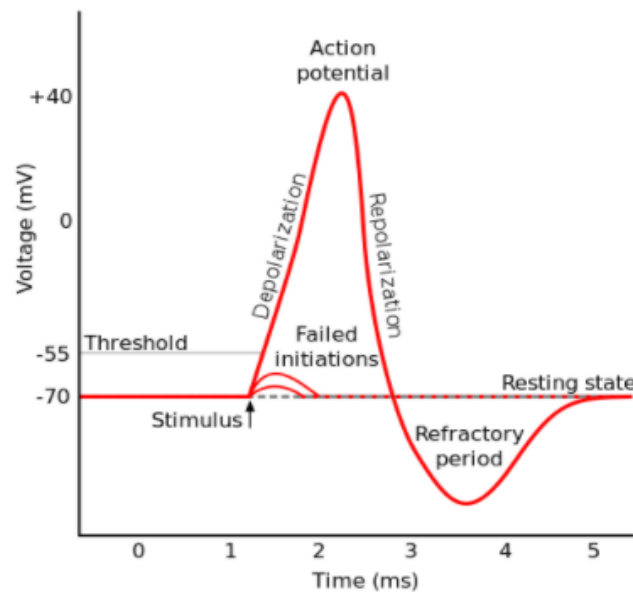


Fig. 2 Andamento qualitativo della differenza di potenziale della membrana neuronale.

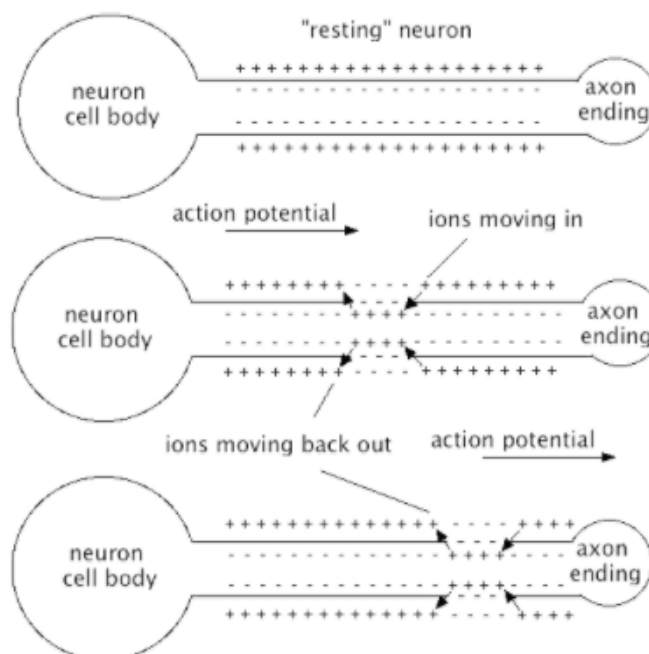


Fig. 3 Schema del processo di trasmissione dell'impulso nervoso lungo il neurone.

Una volta raggiunta la parte terminale dell'assone, il potenziale d'azione fa sì che si aprano i canali di calcio voltaggio-dipendenti; ioni  $Ca^{2+}$  entrano quindi nell'assone determinando la fusione dei bottoni sinaptici con

la membrana neuronale, e perciò il rilascio dei neurotrasmettitori nello spazio sinaptico. Questi si legano ai recettori del neurone postsinaptico e il processo si ripete.

### 3. Stimolazione dei neuroni

Vi sono vari metodi per stimolare artificialmente i neuroni e nel prosieguo saranno descritti i principali e più efficienti.

#### 3.1 Stimolazione elettromagnetica

La stimolazione magnetica transcranica (TMS) costituisce il metodo per eccellenza per agire sull'attività neuronale poiché è una tecnica poco invasiva che consente di ottenere sia alta risoluzione spaziale che maggiore penetrazione.

Il principio che sta alla base è l'induzione elettromagnetica, anche nota come Legge di Faraday:

$\nabla \times E = - \frac{\delta B}{\delta t}$  con E campo elettrico generato dal campo magnetico B. Si ha perciò a che fare con un campo magnetico che varia nel tempo, di solito generato da uno o più solenoidi percorsi da corrente.

Il campo elettrico che si forma determina la depolarizzazione o iperpolarizzazione dei neuroni, e quindi rispettivamente l'eccitazione o l'inibizione dell'attività neuronale.

In questo ambito, il lavoro svolto dal gruppo di Oluwaponmile F. Afuwape<sup>[1]</sup> ha lo scopo di fornire le basi per valutare l'applicabilità in ambito medico di tre bobine di stimolazione (dette "coil") di nuova generazione: il "quadruple butterfly coil" (QBC), il "triple halo coil" (THC) e le bobine Magventure B65.

A tale scopo il campo elettromagnetico viene modellizzato tramite simulazione e i valori così ottenuti sono confrontati con i valori sperimentali della differenza di potenziale indotta.

Il sistema consiste in un mezzo composto da gel di acido poliacrilico, cloruro di sodio e acqua posizionato in un contenitore cubico, di lato 200 mm nella simulazione e 203 mm nell'esperimento, che funge da materia cerebrale. La sua conduttività elettrica è di circa 0.47 S/m mentre la permittività relativa è pari a circa 80. Sia nella simulazione che nell'esperimento l'origine del sistema di riferimento si trova in corrispondenza del centro della superficie del mezzo; in particolare, l'origine dell'asse z è presa in modo tale che la posizione dei tre coil corrisponda a  $z=0$ , con il valore della coordinata che aumenta all'aumentare della profondità nel mezzo.

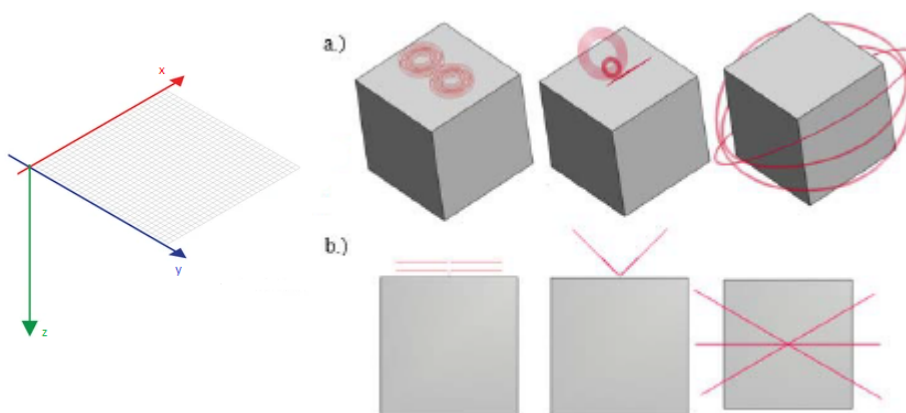


Fig. 4 Configurazione del sistema: a) visione 3D

b) di profilo.

Sono rappresentati rispettivamente il coil B65, il QBC e il THC.

A causa della sua particolare struttura, il THC è stato posizionato a distanza maggiore (100 mm) dalla superficie rispetto al QBC e al coil B65 (entrambi a 10 mm dalla superficie).

I valori di interesse (campo elettrico nella simulazione, differenza di potenziale nell'esperimento) sono stati

presi in corrispondenza dell'origine e poi nel piano coronale (piano xz) e nel piano longitudinale (piano yz) a step di 10 mm lungo ciascun asse.

Nella simulazione è stato utilizzato un singolo impulso di corrente con ampiezza 5000 A e frequenza operativa di 2500 Hz.

Nell'esperimento invece per effettuare le misure è stato utilizzato un apparato intracranico costituito da una griglia di 32 contatti a disco di platino e iridio con spaziatura di 10 mm e impedenza in loco di 1.0 - 3.0 k $\Omega$  a 1 kHz.

I dati sperimentali o ottenuti tramite simulazione riportati nell'articolo si riferiscono al coil B65, sebbene le misure siano state effettuate anche con il QBC e il THC.

Di seguito sono presentati l'andamento del campo elettrico ottenuto tramite simulazione e della differenza di potenziale misurata sperimentalmente, entrambi rappresentati in funzione della distanza. Sono riportati rispettivamente l'andamento sul piano coronale e sul piano longitudinale.

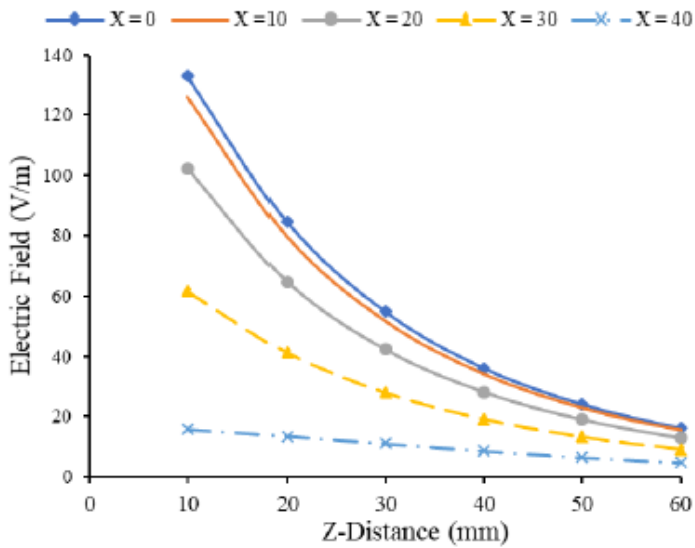


Fig. 5

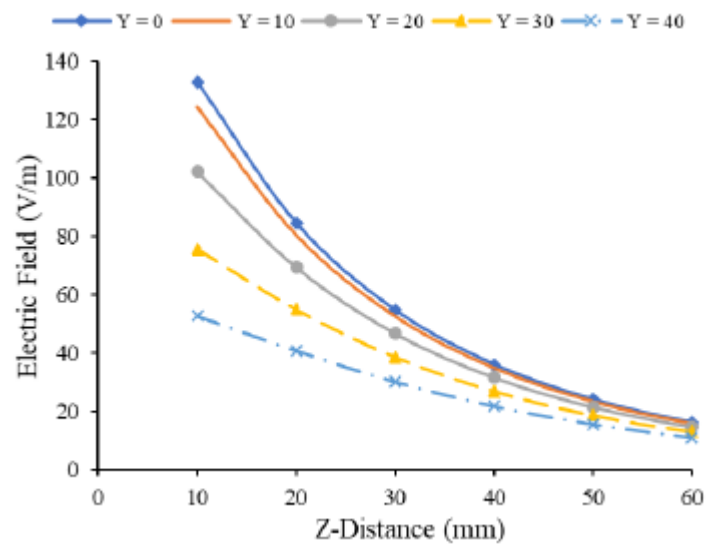


Fig. 6

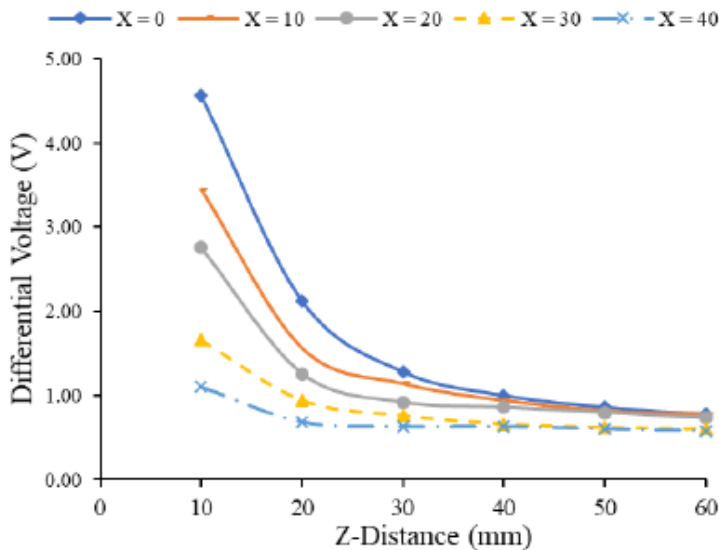


Fig. 7

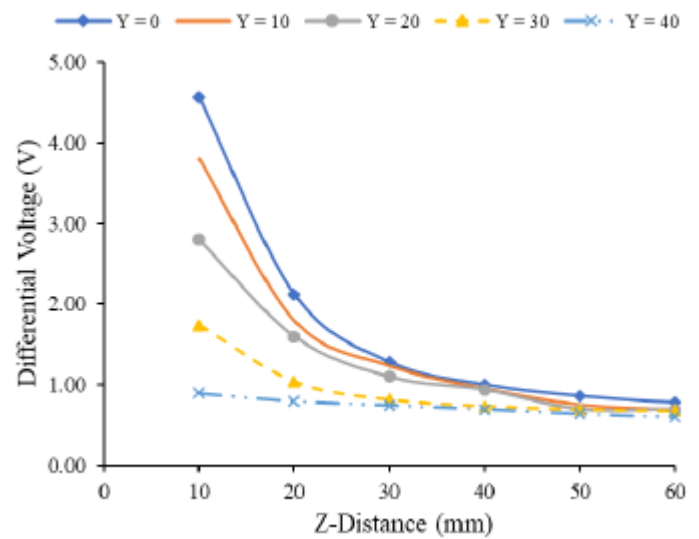


Fig. 8



Nei grafici ottenuti dai dati sperimentali si osserva un andamento che diventa lineare in prossimità della coordinata  $z=50$  mm, in contrasto con l'andamento proporzionale all'inverso della distanza previsto e osservato nei grafici dei dati da simulazione. Gli autori propongono che ciò sia dovuto ad un aumento della differenza di potenziale presente all'interfaccia elettrodo/gel, un aspetto da tener conto nelle applicazioni mediche dello strumento.

Un'ulteriore valutazione dei dati da simulazione è fornita dai grafici che rappresentano il campo elettrico indotto lungo l'asse x e lungo l'asse y:

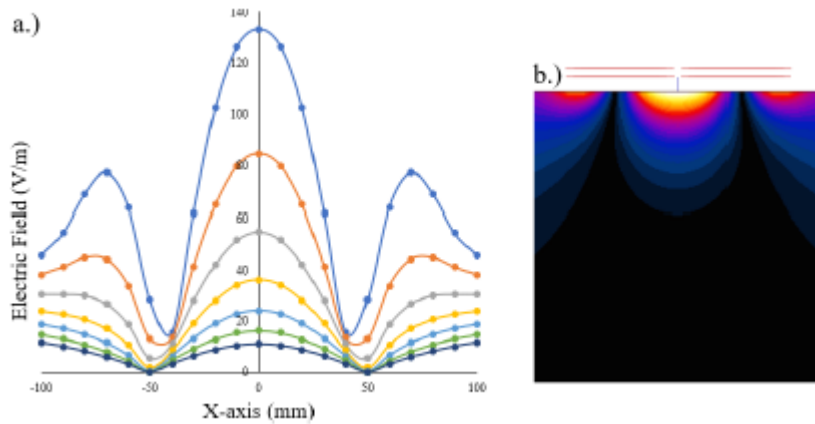


Fig. 9 a) Campo elettrico del coil B65 lungo l'asse x.

b) Visualizzazione sul piano coronale dell'intensità del campo.

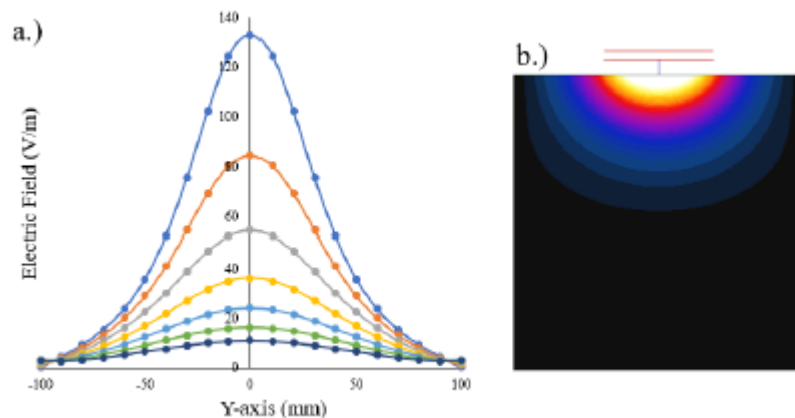


Fig. 10 a) Campo elettrico del coil B65 lungo l'asse y.

b) Visualizzazione sul piano longitudinale dell'intensità del campo.

Si vede quindi che lungo l'asse x il campo elettrico presenta tre lobi a causa della geometria del coil B65: un massimo alla posizione  $x=0$  mm, due minimi alle posizioni  $x=50$  mm e  $x=-50$  mm, e due massimi secondari per  $x=80$  mm e  $x=-80$  mm.

Lungo l'asse y invece il campo elettrico presenta un andamento a campana con il massimo in corrispondenza di  $y=0$  mm.

Svolgendo la simulazione e la presa dati anche con gli altri due tipi di coil, è possibile confrontare i tre diversi campi elettrici (le intensità del campo per QBC e THC sono normalizzate al valore massimo del campo prodotto dal coil B65):

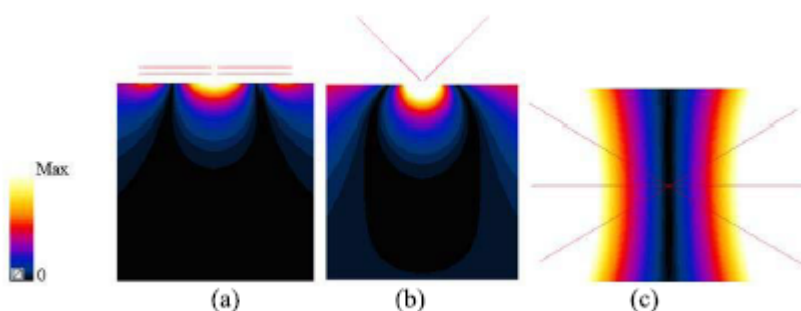


Fig. 11 Visualizzazione sul piano coronale dell'intensità del campo elettrico prodotto da a) coil B65 b) QBC c) THC.

Risulta quindi che all'origine il campo elettrico ha intensità maggiore per il coil QBC, e ciò è da tener presente nelle applicazioni mediche nel caso in cui si voglia agire sugli strati più esterni della corteccia cerebrale.

Infine, un ulteriore confronto tra i tre diversi sistemi è fornito dal grafico rappresentante l'intensità del campo elettrico indotto in funzione della coordinata  $z$ , cioè della profondità all'interno del mezzo. Tale confronto è stato effettuato sia con i coil in posizione (40 mm, 0 mm,  $z$ ) (Fig. 12) che in posizione (100 mm, 0 mm,  $z$ ) (Fig. 13).

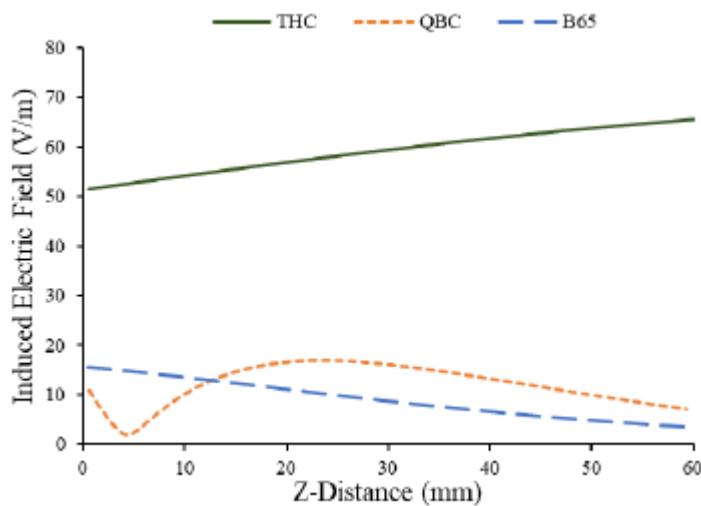


Fig. 12 Campo elettrico indotto in funzione della coordinata  $z$  con i coil in posizione (40 mm, 0 mm,  $z$ ).

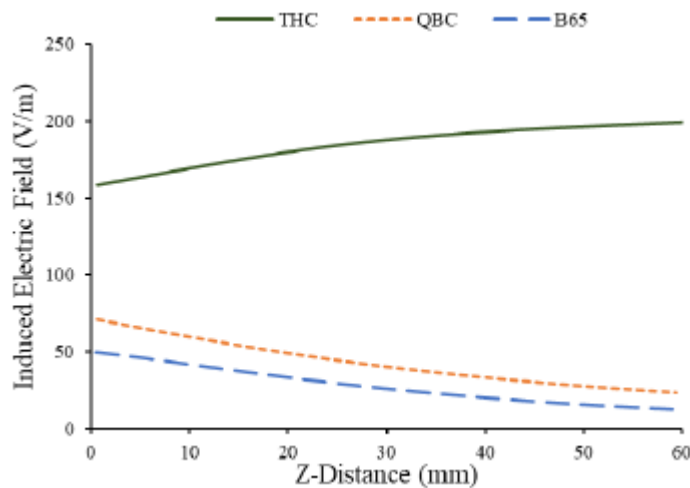


Fig. 13 Campo elettrico indotto in funzione della coordinata  $z$  con i coil in posizione (100 mm, 0 mm,  $z$ ).

Si vede quindi che, mentre per il QBC e il coil B65 il valore del campo diminuisce all'aumentare della coordinata  $z$ , il THC ha un andamento opposto ed è dunque più adatto per la stimolazione a maggiori profondità.

Un lavoro volto a studiare come ottenere maggiore risoluzione spaziale possibile è quello condotto dal gruppo di Ivan C. Carmona<sup>[2]</sup>. Tramite simulazione sono stati valutati gli effetti di due diversi array di solenoidi sui neuroni della corteccia motoria primaria (M1) e secondaria (M2) di ratti, tenendo conto che le zone da stimolare sono superfici dell'ordine del  $\text{mm}^2$ .

I due coil considerati sono costituiti da due o cinque solenoidi ellittici a doppio avvolgimento con un nucleo ferromagnetico di AISI 1010 (acciaio a basso contenuto di carbonio). Tale acciaio ha magnetizzazione di saturazione di circa 2 T (così da avere modulo del campo elettrico intorno ai 100 V/m) e permeabilità relativa  $\mu_r = 667.75$ .

Ciascun solenoide ha altezza 25.4 mm, 50 spire in totale e semiassi di 10.6 mm e 2.8 mm, mentre il filo che lo costituisce ha diametro 1 mm.

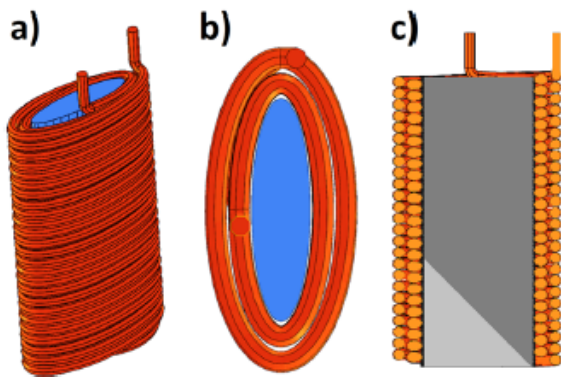


Fig. 14 Struttura di ciascun solenoide utilizzato.

a) Visione 3D

b) Visione dall'alto

c) Visione di lato (evidenziato in grigio scuro il nucleo di acciaio con un profilo a V)

Nella prima configurazione i due solenoidi sono affiancati, mentre successivamente si considera un array di quattro solenoidi posti a forma di rombo con un quinto solenoide centrale:

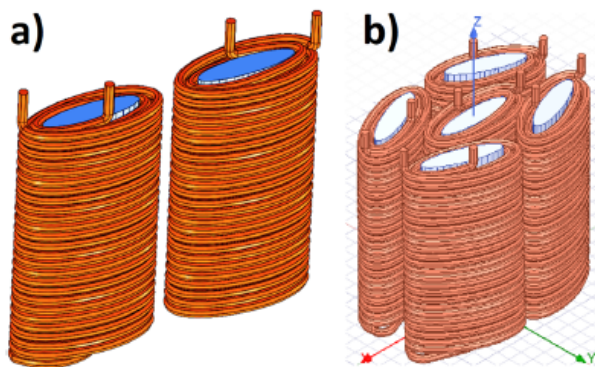


Fig. 15 a) Coil di due solenoidi

b) Coil di cinque solenoidi (con rappresentato anche il sistema di riferimento usato)

La simulazione è stata effettuata considerando come nucleo non solo l'acciaio AISI 1010, ma anche l'aria. Nel caso dei due solenoidi si è valutato anche il caso in cui l'acciaio ha un profilo a V (con la parte appuntita di ciascun nucleo posizionata nel centro dell'array).

Per stimare il valore dei campi magnetico ed elettrico a varie profondità nella materia cerebrale gli autori hanno prima dovuto modellizzare la testa del ratto. Il modello 3D creato approssima il sistema come una sfera di diametro 30.00 mm, e ad ogni strato (scalpo, cranio, tessuti connettivi ecc...) vengono assegnate le proprietà elettromagnetiche presenti nei corrispondenti strati della testa di un ratto adulto. Per semplificare, tali proprietà sono state considerate omogenee ed isotrope e gli strati meno spessi sono stati inglobati negli strati adiacenti aventi le caratteristiche elettromagnetiche più simili. Si è quindi ottenuto un modello a quattro strati, le cui proprietà sono riportate nella tabella 1.

Lo stimolo utilizzato consiste in un singolo impulso bipolare di corrente con andamento cosinusoidale con frequenza 2500 Hz, ma ampiezze diverse a seconda della configurazione: 5 kA nel caso di due solenoidi e 10 kA nel caso di cinque solenoidi.

Actual Layer in the Rat Head	Layer in the Simplified Head Model	Thickness ( $\mu\text{m}$ )	Electrical Conductivity ( $\sigma$ ) [S/m]	Relative Electric Permittivity ( $\epsilon_r$ )	Relative Magnetic Permeability ( $\mu_r$ )
Scalp	Scalp	500	0.17	12000	$\approx 1$
Periosteum		100	Approximated to the same as the scalp		
Skull	Skull	1000	0.01	800	$\approx 1$
Dura mater		300	Approximated to the same as the skull		
Arachnoid	Cerebrospinal Fluid (CSF)	75	1.654	6000	$\approx 1$
Sub-arachn. S.		750	Approximated to the same as the CSF		
Pia Matter	Brain cortex	25	Approximated to the same as the GM		
Gray Matter (GM)		...	0.276	12000	$\approx 1$

Tab. 1 Proprietà elettromagnetiche del modello della testa del ratto (tabella tratta dall'articolo [2], p.5).

Alcune considerazioni sul coil a due solenoidi affiancati meritano particolare attenzione. Il primo aspetto rilevante riguarda la dipendenza dei campi magnetico ed elettrico dalla profondità nella materia cerebrale: osservando i grafici in Fig. 16 si nota infatti una diminuzione dell'intensità di entrambi i campi all'aumentare del modulo della coordinata  $z$  (che per come è stato scelto il sistema di riferimento avrà valore negativo). Ciò è dovuto alla dispersione sia delle linee di flusso del campo magnetico che delle cariche. Per quest'ultime in particolare la dispersione assume una forma conica che permette di individuare le direzioni lungo le quali la densità di corrente è maggiore.

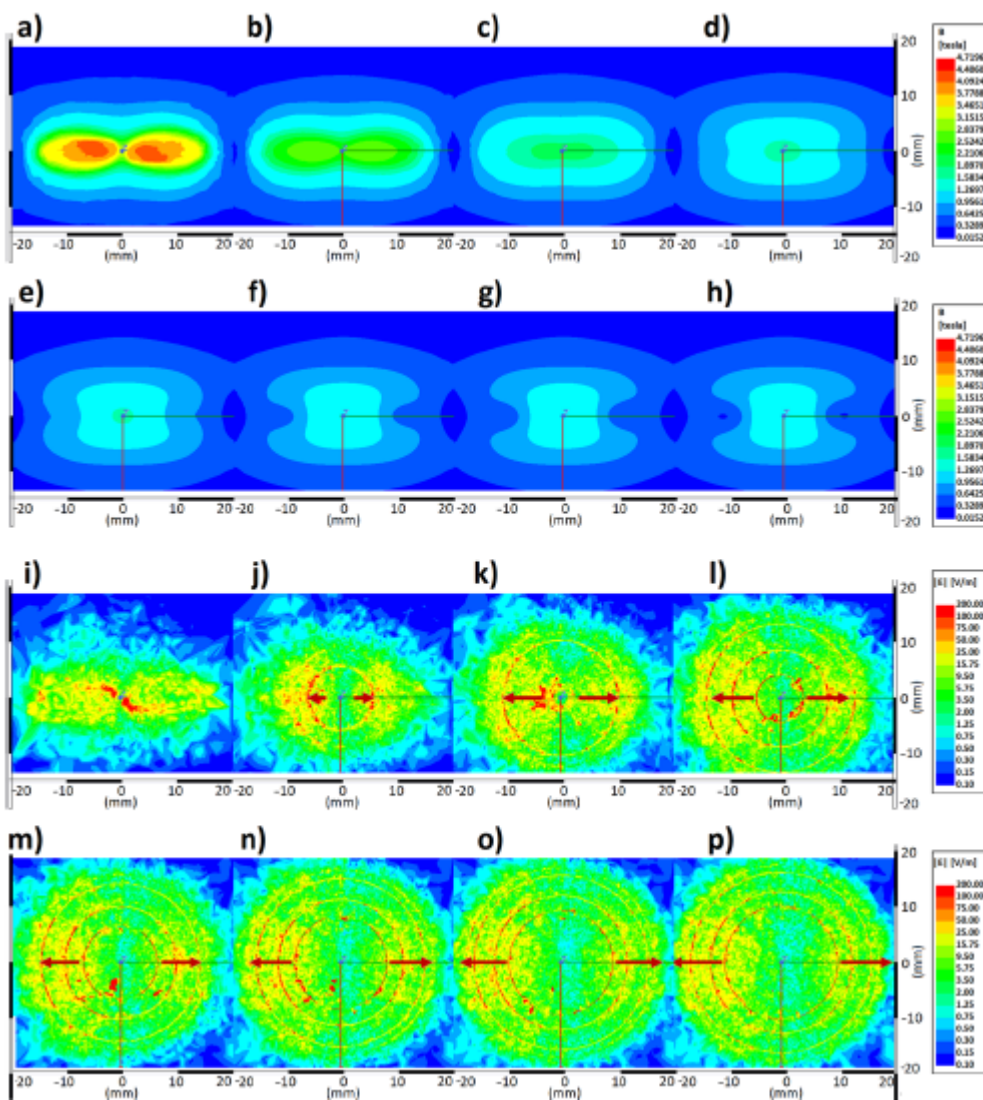


Fig. 16 |B| a profondità  
a) 0.0 mm b) 1.00 mm  
c) 2.00 mm d) 2.50 mm  
e) 3.00 mm f) 3.75 mm  
g) 4.00 mm h) 4.25 mm  
e |E| a profondità  
i) 0.0 mm j) 1.00 mm  
k) 2.00 mm l) 2.50 mm  
m) 3.00 mm n) 3.75 mm  
o) 4.00 mm p) 4.25 mm.  
Le frecce rosse indicano  
il verso di dispersione  
delle cariche.

Un ruolo importante è svolto anche dal tipo di materiale contenuto nei solenoidi. Nel piano  $z=0$  mm si nota infatti che con aria e profilo a V dell'acciaio si ha un campo elettrico molto intenso nel centro dell'array (in particolare per il profilo a V), mentre nel caso dell'acciaio che occupa uniformemente lo spazio interno dei solenoidi il campo elettrico non presenta una zona di maggiore intensità ma ha un andamento abbastanza uniforme (Fig. 17). Questo diverso comportamento è quindi da tener presente nelle applicazioni mediche se si vuole lavorare con la corteccia cerebrale più esterna.

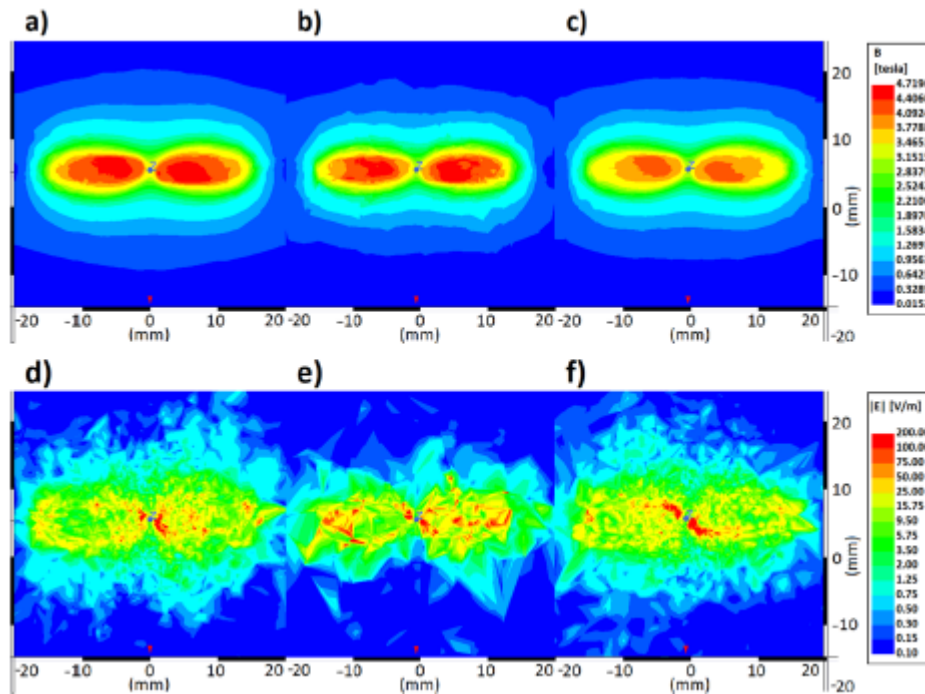


Fig. 17 Campo magnetico con nucleo di a) aria b) acciaio uniforme c) acciaio con profilo a V e campo elettrico con nucleo di d) aria e) acciaio uniforme f) acciaio con profilo a V.

Nel caso del coil a cinque solenoidi, a causa della particolare disposizione, le cariche indotte dai quattro solenoidi esterni, essendo dello stesso segno di quelle centrali, fanno sì che la dispersione delle cariche dovuta al solenoide centrale avvenga lungo una direzione ben definita, che per il sistema considerato sarà l'asse z. È quindi possibile orientare il fascio centrale in modo da farlo passare attraverso la regione interessata, ottenendo così elevata risoluzione spaziale.

La dispersione complessiva delle cariche ha dunque forma conica, con una direzione centrale ad alta densità di corrente (Fig. 18).

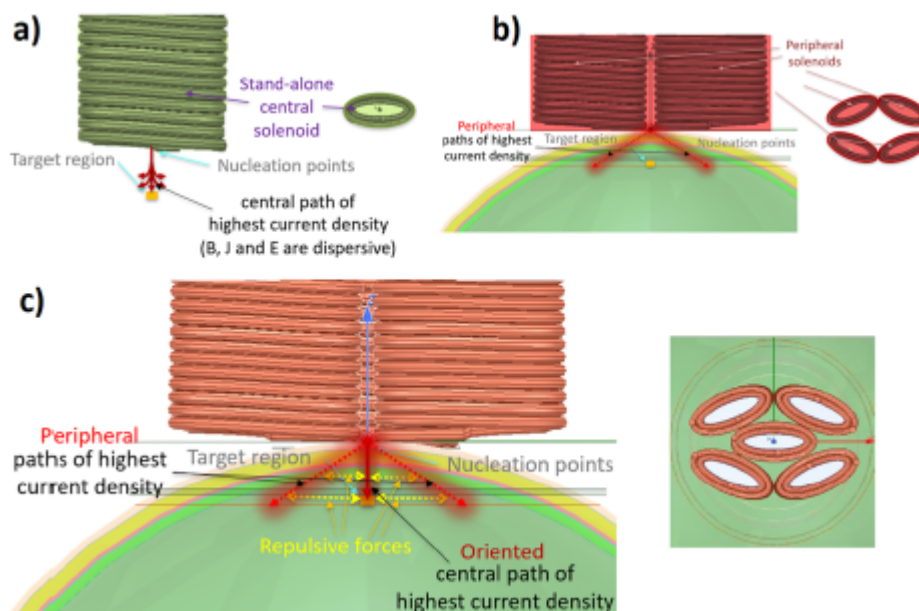


Fig. 18 Configurazione a cinque solenoidi con individuate le direzioni ad alta densità di corrente.



Dopo una certa profondità la dispersione delle cariche periferiche non permetterà più di avere un fascio centrale ben definito, ma è comunque possibile far arrivare alla zona interessata una quantità sufficiente di cariche ad alta densità di corrente.

Rispetto al coil a due solenoidi, la configurazione a cinque solenoidi è dunque più adatta a stimolare aree dell'ordine del  $\text{mm}^2$ , anche grazie alla quantità trascurabile di energia dissipata (208.9 mJ per impulso di corrente e 1.10 nJ per  $\text{mm}^3$  di tessuto cerebrale). Tenendo presente la breve durata dell'impulso (400  $\mu\text{s}$ ) si può infatti affermare che l'aumento di temperatura è insignificante e l'apparato è quindi sicuro per le applicazioni mediche.

Un diverso approccio consiste nell'usare il momento meccanico generato dal campo magnetico per attivare le pompe ioniche, canali ionici suscettibili a stimolazioni meccaniche. Il lavoro condotto dal gruppo di Jung-uk Lee<sup>[3]</sup> si basa proprio su questo principio. Lo strumento utilizzato consiste in un array circolare di magneti (CMA) e un generatore di momento magnetico meccanico ("magnetic torque"), chiamato m-Torquer (Fig. 19).

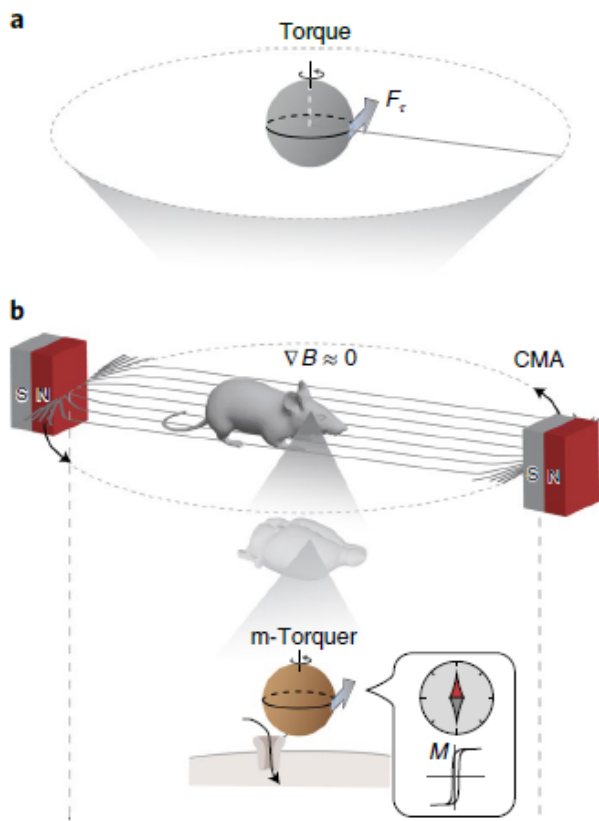


Fig. 19 Setup dell'esperimento.

a) m-Torquer

b) CMA con l'organismo da studiare sul quale è impiantato l'm-Torquer

Quest'ultimo è formato da un substrato sferico di polistirene di diametro 500 nm sul quale si trovano nanoparticelle ottaedriche. Ciascuna nanoparticella è costituita da ossido di ferro in configurazione di antispinello (minerale che cristallizza nel sistema cubico con i componenti in coordinazione prevalentemente ottaedrica) di dimensione 25 nm con 8 facce {111}. Tali facce hanno momenti magnetici più intensi rispetto a quello del nucleo della nanoparticella, e ciò determina l'anisotropia dell'm-Torquer. Le nanoparticelle sono inoltre caratterizzate da un debole ferromagnetismo con campo coercitivo  $H_c=30$  Oe a temperatura ambiente e magnetizzazione di saturazione  $M_s=167$  emu/g. Per quanto riguarda l'm-Torquer, il campo coercitivo è lo

stesso delle nanoparticelle ma la magnetizzazione di saturazione è pari a  $M_s = 2.3 \cdot 10^{-12}$  emu a temperatura ambiente.

I magneti costituenti il CMA sono posizionati equatorialmente sullo stesso piano del campione e l'effetto complessivo è un campo magnetico uniforme ( $\nabla B < 10$  mT/m e  $|B| \geq 20$  mT) rotante con un notevole raggio d'azione, che può arrivare fino a qualche decina di centimetri.

Partendo dalla configurazione a due magneti si nota che la zona di campo magnetico uniforme diminuisce con l'aumentare della distanza tra i magneti (Fig. 20a). Variando invece il numero di magneti tale zona ha superficie maggiore (Fig. 20b). La configurazione finale è costituita da 10 magneti agenti su un diametro di 70 cm (Fig. 20c).

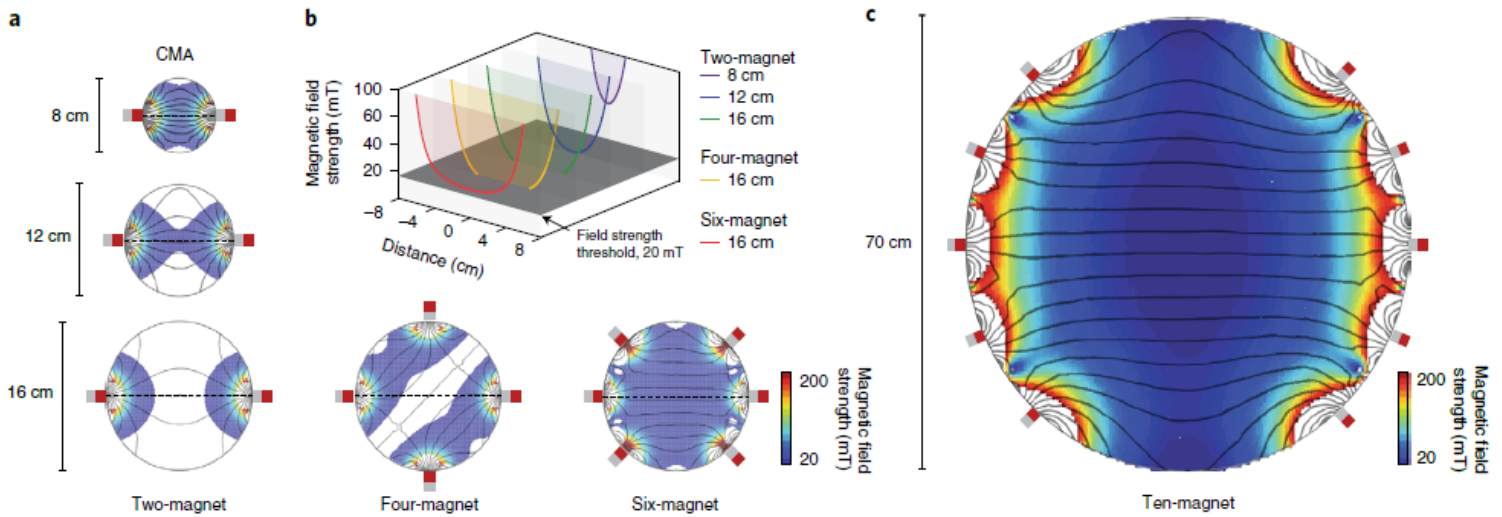


Fig. 20 Campo magnetico a) al variare della distanza tra i due magneti b) al variare del numero di magneti. c) Configurazione finale a 10 magneti.

Per misurare la forza generata dall'm-Torquer è stata posizionata sulla sua superficie una sonda fluorescente e il sistema così ottenuto è stato posto in un fluido (200  $\mu$ l di glicerolo o olio di silicone per determinare rispettivamente il valore minimo e massimo della forza). La forza di drag (o resistenza fluidodinamica)  $\tau$  è quindi data la legge di Stokes in un mezzo viscoso:

$$\tau = 8\pi\eta R^3 \omega_{\max} \quad \text{con } \eta = \text{viscosità}$$

$R$  = raggio dell'm-Torquer

$\omega_{\max} = \omega_{\max}(|B|)$  = velocità angolare massima per un valore specifico di campo magnetico (intesa come la velocità angolare del più veloce campo rotante applicato all'm-Torquer)

Di conseguenza la forza è data da  $F_\tau = \tau/R$  e risulta essere dipendente dal modulo del campo magnetico,  $F_\tau = F_\tau(|B|)$  (Fig. 21). In particolare, l'intensità del campo è stata variata cambiando il numero di magneti o il diametro dell'array. Per limitare il rischio di rottura delle membrane cellulari, sono state considerate solo forze inferiori a 10 pN.

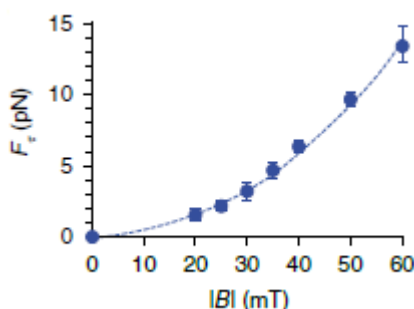
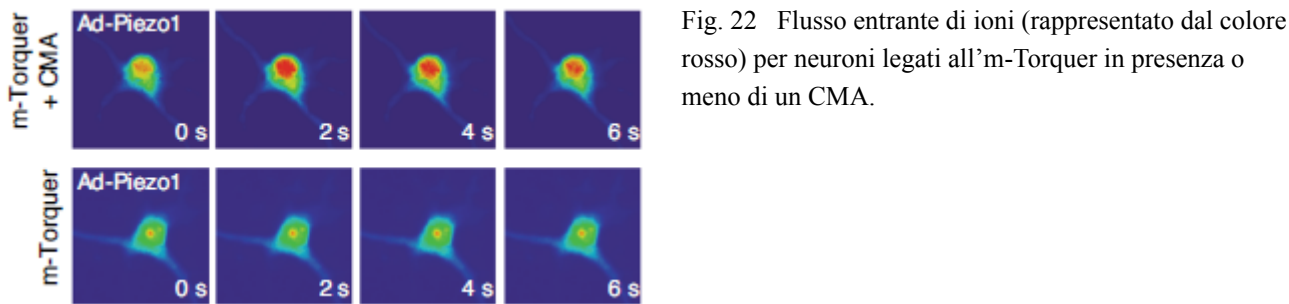


Fig. 21 Forza generata dall'm-Torquer in funzione del campo magnetico,  $F_\tau(|B|)$ .

Gli autori hanno lavorato sia in vitro, usando neuroni di topi, che in vivo, agendo sui topi stessi, ed in entrambi casi i canali ionici considerati sono i Piezo1.

Per quanto riguarda lo studio in vitro, sono stati effettuati alcuni interventi fisiologici in modo che l'm-Torquer si legasse ad un'estremità dei canali ionici per aprirli o chiuderli. I neuroni sono quindi stati stimolati con un CMA rotante con frequenza 0.5 Hz e il flusso entrante di ioni è stato osservato tramite il colorante X-Rhod-1; una fluorescenza intensa di colore rosso rivela l'avvenuta apertura dei canali Piezo1. Al contrario, se non si applica il CMA tale fluorescenza non si osserva e quindi non si ha il passaggio di ioni (Fig. 22).



Successivamente i canali Piezo1 sono anche stati attivati in modo ripetitivo tramite impulsi magnetici di durata 0.5 s forniti dal CMA a seguito di rotazioni di 90°; l'attivazione dei canali ionici è rivelata dalla presenza di picchi consecutivi nel grafico della fluorescenza (Fig. 23).

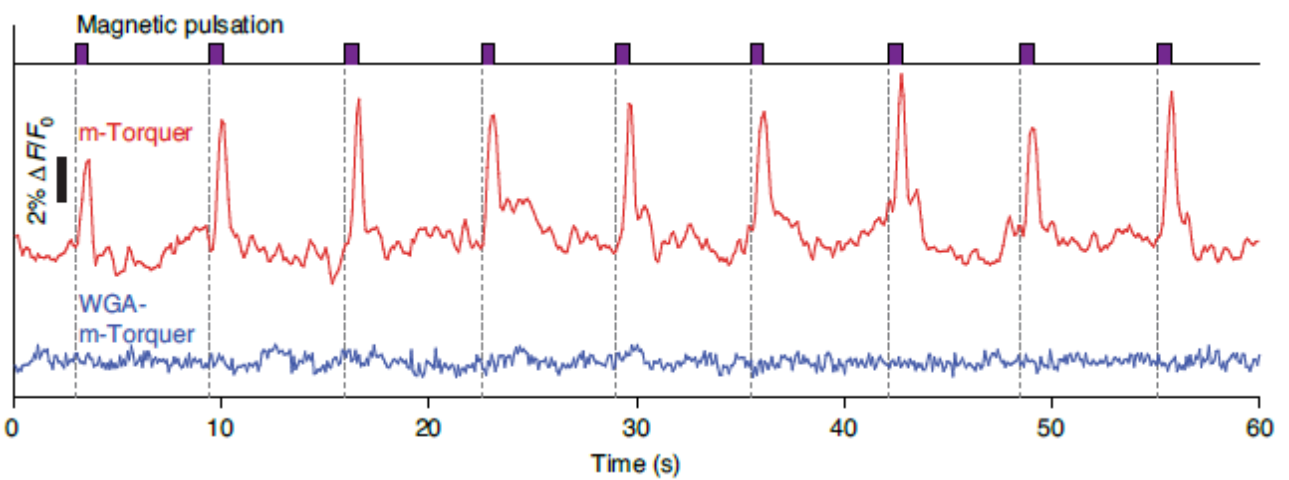


Fig. 23 Fluorescenza in funzione del tempo per le stimolazioni ripetitive. In rosso il segnale dato dal colorante X-Rhod-1 per neuroni legati all'm-Torquer e soggetti al CMA. In blu il segnale fornito da una coltura di controllo (trattata con agglutinina del germe di grano, WGA).

Passando alla stimolazione in vivo, la zona di interesse (la regione M2 della corteccia premotoria) è stata sottoposta a procedure fisiologiche analoghe al caso precedente e sono stati osservati gli effetti sul moto. I topi sono stati posizionati in un CMA di diametro 16 cm e dotato di sei magneti, che si alternavano ad intervalli di 2 s tra stato acceso e spento. Si è osservato che l'm-Torquer determina una maggiore velocità di movimento e una maggiore distanza percorsa rispetto ai topi dotati di m-Torquer ma in assenza del CMA (Tab. 2 e Fig. 24).

	velocità media (mm/s)	distanza totale media percorsa (mm)
topi con m-Torquer in presenza di CMA	11.2	330
topi con m-Torquer in assenza di CMA	2.3	70

Tab. 2 Effetti sulla cinematica dei topi trattati con m-Torquer in presenza o meno del CMA.



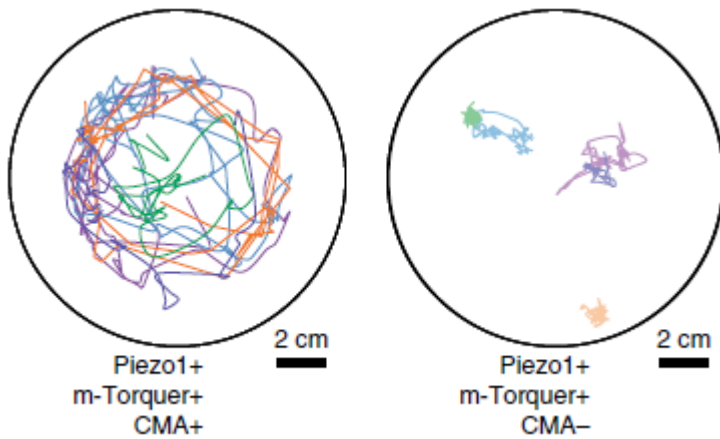


Fig. 24 Traiettorie percorse da cinque topi dotati di m-Torquer in presenza o meno del CMA.

L'm-Torquer si rivela quindi uno strumento particolarmente utile per stimolare meccanicamente l'attività neuronale; non solo consente di lavorare a distanza su organismi liberi di muoversi, ma permette anche di avere una buona risoluzione spaziale e di riprodurre facilmente la neurostimolazione. Inoltre può essere un buon punto di partenza per studiare fenomeni sensibili alle stimolazioni meccaniche, come ad esempio la ricezione sensoriale, lo sviluppo dei tessuti o i meccanismi biologici cellulari.

### 3.2 Stimolazione elettrica dei canali di calcio

Un diverso approccio per modulare l'attività neuronale consiste nell'agire direttamente sui canali ionici voltaggio-dipendenti fornendo una differenza di potenziale, anche variabile, tale da consentire il passaggio di ioni attraverso la membrana cellulare. Il lavoro del gruppo di M. Giacomello<sup>[4]</sup> si concentra ad esempio sulla stimolazione dei canali di calcio di neuroni dell'ippocampo di ratti e neuroni della corteccia frontale e dell'ipotalamo di bovini. L'apparato utilizzato è un array di 64 condensatori; ciascuno di questi è formato da uno strato di silicio di tipo n drogato con boro, uno strato isolante spesso 10 nm di diossido di silicio (permittività relativa  $\epsilon=3.9$ ), e l'elettrolita. Ogni condensatore ha forma ottagonale (larghezza massima 40  $\mu\text{m}$ ) e capacità specifica 0.35  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ . L'array di condensatori è quindi isolato attraverso uno strato di 600 nm di ossido di silicio e montato su un chip che si trova in una camera di plexiglas contenente il terreno di coltura delle cellule studiate.

È quindi possibile effettuare una sollecitazione capacitiva che è poco invasiva data l'assenza di correnti dovute a reazioni redox. Lo stimolo utilizzato ha ampiezza 1 V, con un tempo di salita di circa 4 V/ms per impulso di durata 5 ms. Le risposte del sistema stimolato sono state ricavate tramite un microscopio a fluorescenza e l'intensità è stata normalizzata al valore di fondo scala ( $\Delta F/F_0$ ).

Tutte le misurazioni sono state effettuate con una concentrazione extracellulare di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  pari a 1 mM. Osservando i grafici ottenuti sperimentalmente (Fig. 25) si evince che il transiente è analogo per forma e durata ai comuni segnali fisiologici che avvengono nel soma neuronale quando si genera il potenziale d'azione.

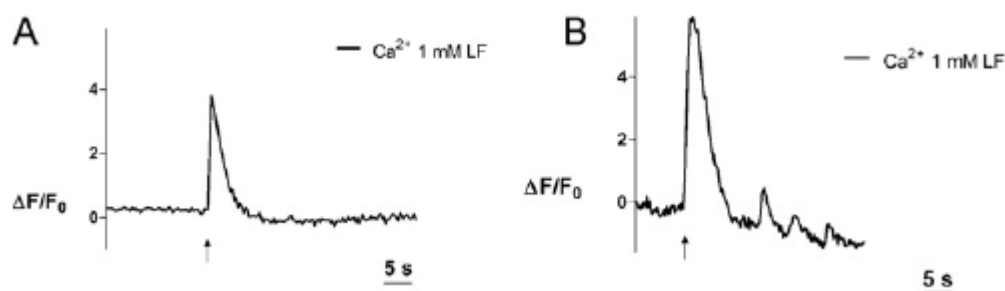


Fig. 25 A) Transiente in un neurone dell'ippocampo del ratto B) Transiente in un neurone della corteccia cerebrale del bovino (le frecce indicano l'applicazione dell'impulso)

In seguito è stata effettuata una stimolazione iterativa utilizzando lo stesso stimolo usato in precedenza. I neuroni dell'ippocampo del ratto sono stati sollecitati tre volte ad intervalli di 20 s, ottenendo così un'attivazione ripetitiva dei canali di calcio (Fig. 26).

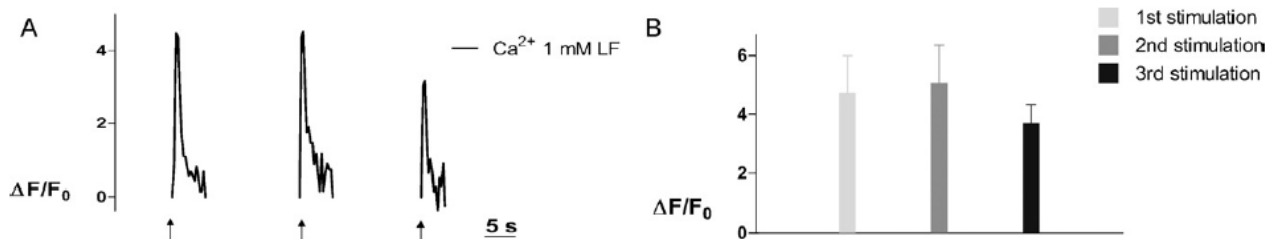


Fig. 26 Stimolazione iterativa dei canali di calcio.

A) Transienti (le frecce indicano il punto in cui è stato applicato l'impulso)

B) Confronto dei valori medi delle ampiezze ottenute nelle tre stimolazioni: - prima:  $\Delta F/F_0 = 4.73 \pm 1.26$ ,  $N=32$   
 - seconda:  $\Delta F/F_0 = 5.07 \pm 1.29$ ,  $N=32$  - terza:  $\Delta F/F_0 = 3.69 \pm 0.63$ ,  $N=24$   
 (nota: l'errore riportato corrisponde allo scarto quadratico medio)

Osservando i grafici in Fig. 26 si nota subito che i transienti sono simili, sebbene per la terza sollecitazione l'ampiezza del picco è minore.

In normali condizioni fisiologiche si suppone che i canali di calcio voltaggio-dipendenti localizzati nel soma o nei dendriti ad esso limitrofi determinino i transienti osservati nel processo di depolarizzazione: tramite un flusso iniziale entrante di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  ha infatti inizio il rilascio dello stesso tipo di ioni dal reticolo endoplasmatico (che circonda il nucleo), e aumenta così la concentrazione di ioni calcio all'interno della cellula.

Gli autori suppongono che un meccanismo analogo stia alla base dei risultati osservati, e in effetti in seguito alle stimolazioni ripetitive si sono osservate risposte anch'esse ripetitive da parte degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ .

L'apparato utilizzato presenta il vantaggio di essere poco invasivo (in quanto la stimolazione è di tipo capacitivo) e permette di agire in modo selettivo sui neuroni, lavorando sia su cellule singole che su gruppi di cellule. L'array di condensatori utilizzato potrebbe dunque essere sfruttato per ulteriori studi sui processi elettrofisiologici e una serie di tali array consentirebbe una stimolazione in parallelo su più regioni diverse del cervello.

### 3.3 Irradiazione luminosa di cellule neuronali periferiche

Un diverso approccio per sollecitare i neuroni si basa sull'utilizzo di radiazione luminosa con lunghezze d'onda nel visibile. Gli effetti possono essere molto vari non solo per le caratteristiche della luce utilizzata, come intensità, lunghezza d'onda o dose, ma anche per il tipo di cellule studiate. Si parla in particolare di optogenetica, una scienza che combinando ottica e genetica studia appunto gli effetti sull'attività neuronale. Uno dei numerosi studi svolti in tal senso è quello del gruppo di David Diaz Vera<sup>[5]</sup>, condotto sui gangli delle radici dorsali (DRG) e sulle cellule di Schwann (SCs) del sistema nervoso periferico di roditori. Per entrambi i tipi di cellule sono stati valutati gli effetti sulla morfologia, sulla crescita e sulla possibilità di sopravvivenza all'irradiazione.

Lo strumento utilizzato è un array di LED in grado di fornire lunghezze d'onda con massimi di emissione pari a 627, 617, 568, 530 e 470 nm e costruito in modo tale da mantenere costante il valore dell'irradianza ( $1 \text{ mW/mm}^2$ ). Il pattern utilizzato per la stimolazione consiste in dieci impulsi di 5 ms forniti in un intervallo di tempo di 1 s, con 9 s di pausa per evitare che il sistema si scaldi (Fig. 27).

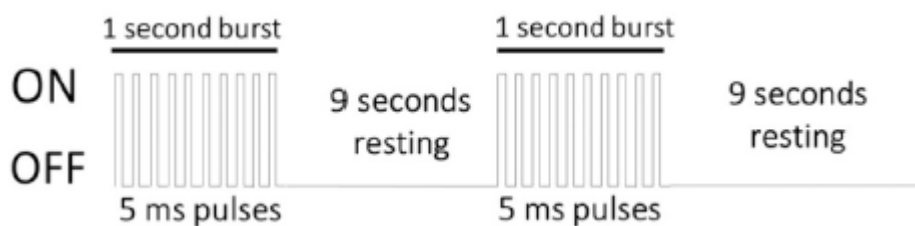


Fig. 27 Pattern utilizzato per la stimolazione neuronale.

I neuroni scelti per essere esaminati sono quelli non in contatto con altri neuroni o con le pareti del contenitore così da evitare eventuali effetti di contatto.

Per quanto riguarda la determinazione degli effetti sulla crescita (intesa come l'aumento della lunghezza dei neuroni), sono state considerate le 10 cellule più grandi e le misurazioni sono state effettuate dopo 24, 48 o 72 ore dall'irradiazione luminosa. Per la morfologia invece sono state valutate 10 cellule a caso e le misure sono state prese subito dopo l'irradiazione per aumentare l'accuratezza del processo di tracciamento del neurite (neurone immaturo) ed evitare effetti dovuti alla crescita (e quindi al contatto tra cellule).

Per ogni configurazione sono stati effettuati minimo tre set di misurazioni condotte in giorni diversi e utilizzando cellule provenienti da campioni diversi. Le misure ottenute sono quindi state confrontate con le colture di controllo, mantenute al buio.

Dal punto di vista statistico si è scelto di valutare come significativi i risultati con p-value inferiore a 0.05.

Partendo dai gangli delle radici dorsali (DRG) la prima cosa valutata è l'effetto della luce sulla crescita dei neuroni, esaminando sia neuroni singoli che espianti.

Nel primo caso le colture sono state irradiate per 150 minuti con lunghezze d'onda di 627, 567 e 470 nm, e le misure sono state effettuate 24 ore dopo. Osservando i valori medi risulta che non ci sono effetti rilevanti rispetto alla coltura di controllo (Fig. 28):

	valore medio di crescita	p-value	valore medio percentuale di crescita
coltura di controllo	$4.6 \pm 3.3 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	///	///
627 nm	$5.7 \pm 3.3 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	0.79	$29 \pm 30 \%$
567 nm	$6.0 \pm 2.3 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	0.70	$32 \pm 37 \%$
470 nm	$4.0 \pm 2.3 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	0.98	$12 \pm 13 \%$

Tab. 3 Effetti sulla crescita dei DRG a seguito di radiazione luminosa.

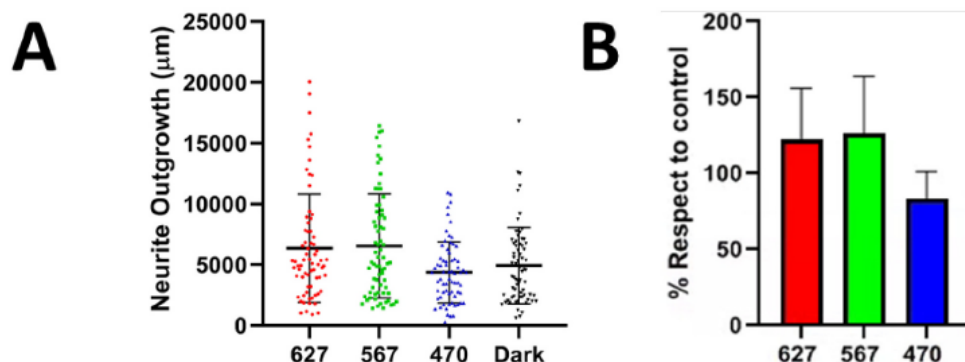


Fig. 28 A) Crescita del neurite a tre diverse lunghezze d'onda e per le cellule di controllo  
B) Grandezza in percentuale rispetto alle cellule di controllo

Anche nel caso degli espianti di DRG non si nota alcun effetto sulla crescita. La luce pulsata utilizzata ha lunghezza d'onda 627 o 470 nm ed il tempo di esposizione è pari a 600 minuti. Le misure sono state effettuate 72 ore dopo, ottenendo i seguenti valori medi della superficie occupata ( $p=0.62$ ):

neuroni di controllo	$4.21 \pm 2.72 \text{ mm}^2$
627 nm	$3.83 \pm 2.59 \text{ mm}^2$
470 nm	$3.09 \pm 2.46 \text{ mm}^2$

Tab. 4 Effetti sulla crescita di espianti di DRG a seguito di radiazione luminosa.

Per quanto riguarda eventuali effetti dovuti alla dose, i neuroni sono stati irradiati con luce di 627 o 470 nm per intervalli di tempo variabili (150, 300, 450, 600 minuti). Al contrario del caso dei 627 nm, in cui la dose non incide sul valore medio della crescita del neurite ( $p>0.80$ ), per i 470 nm si osserva che la crescita diminuisce con l'aumentare della dose:

	valore medio di crescita	p-value
coltura di controllo	$7.9 \pm 2.4 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	///
150 minuti	$4.4 \pm 0.7 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	0.09
300 minuti	$3.6 \pm 0.8 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	0.019
450 minuti	$2.6 \pm 1.2 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	0.003
600 minuti	$2.4 \pm 0.1 \cdot 10^3 \mu\text{m}$	0.002

Tab. 5 Effetti della dose sulla crescita dei DRG.

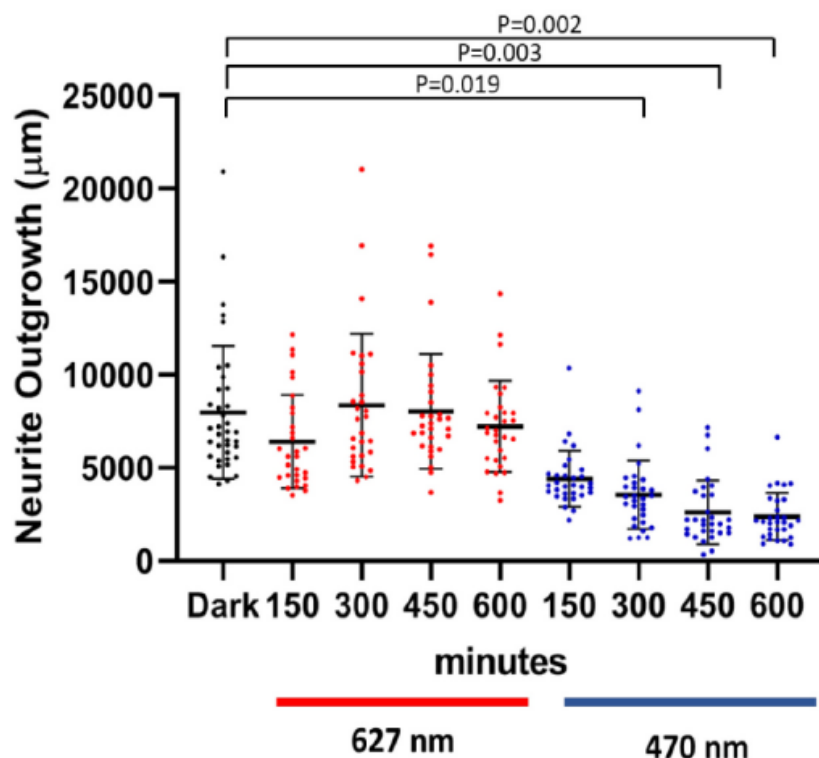


Fig. 29 Crescita del neurite in funzione del tempo di irradiazione per le lunghezze d'onda 627 nm (rosso) e 470 nm (blu), confrontate con le cellule di controllo.

Infine, lo studio degli effetti sulla morfologia rivela l'assenza di differenze significative rispetto alle cellule di controllo ( $p \geq 0.6$ ). I neuroni sono stati investiti di luce pulsata a 627, 567 o 470 nm per 300 minuti, e le misure sono state effettuate subito dopo l'irradiazione considerando il numero di neuriti (dendriti o assone) che si diramano dal soma (chiamati neuriti primari).

cellule di controllo	4.0±0.2
627 nm	3.0±0.4
567 nm	4.0±0.8
470 nm	5.0±0.1

Tab. 6 Numero di neuriti che si diramano dal soma a seguito di radiazione luminosa.

Si nota però una differenza statisticamente non trascurabile tra le cellule del gruppo di 627 nm e quelle del gruppo di 470 nm; in tal caso infatti il p-value è pari a 0.031 e quindi le conseguenze a livello morfologico sono rilevanti.

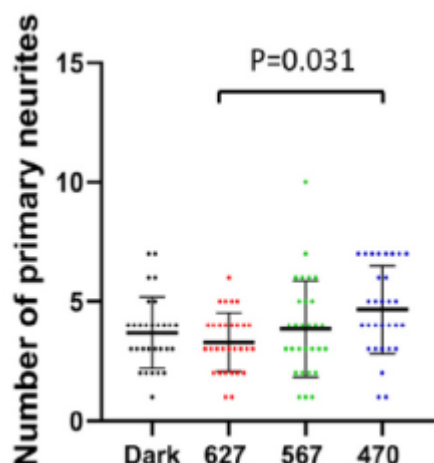


Fig. 30 Numero di neuriti primari per le tre lunghezze d'onda e per le cellule di controllo.

Infine per quanto riguarda la possibilità di sopravvivenza ("viability"), gli autori hanno potuto stabilire che la dose e la lunghezza d'onda non avevano alcuna influenza: infatti tra il 90% e il 96% dei neuroni sopravvivevano alla radiazione senza presentare apprezzabili differenze statistiche rispetto ai neuroni di controllo mantenuti al buio ( $p=0.72$ ). In particolare quindi è possibile affermare che per il gruppo irradiato con luce a 470 nm non è presente una correlazione tra la diminuzione della crescita all'aumentare della dose e la possibilità di sopravvivenza.

Passando alle cellule di Schwann, sono stati verificati gli effetti sull'attività metabolica, sulla proliferazione e sulla morfologia.

Per l'attività metabolica, la luce utilizzata ha lunghezze d'onda di 627, 617, 567, 530 o 470 nm, l'irradiazione ha durata 150 minuti e le misure di fluorescenza sono state effettuate 48 ore dopo. Non sono risultati cambiamenti rispetto alle cellule di controllo, a prescindere dalla lunghezza d'onda ( $p=0.99$ ) (Fig. 31).

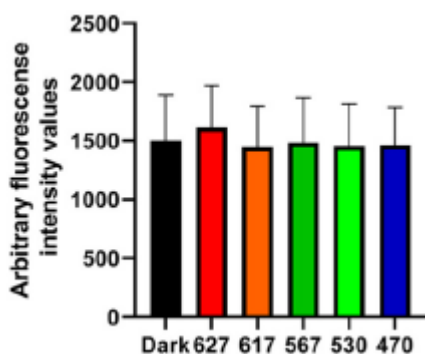


Fig. 31 Intensità della fluorescenza in funzione della lunghezza d'onda, con riportato anche il valore di controllo.

Anche nella valutazione di una eventuale dipendenza dalla dose per le lunghezze d'onda di 627 e 470 nm risulta che non c'è nessun effetto statisticamente significativo ( $p=0.99$ ) (Fig. 32).

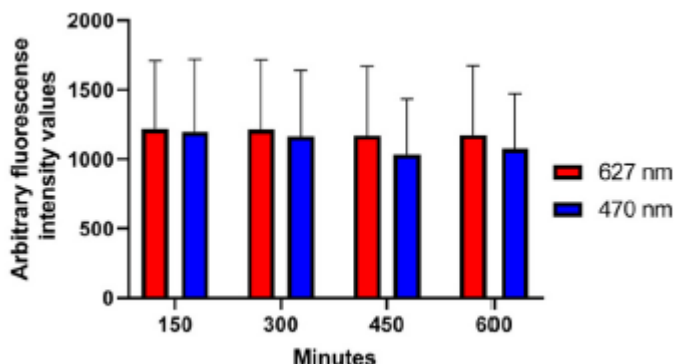


Fig. 32 Intensità di fluorescenza per le lunghezze d'onda 627 e 470 nm a vari intervalli di esposizione alla radiazione.

Nel caso della proliferazione non si notano cambiamenti degni di nota ( $p=0.35$ ), confermando così quanto ottenuto per l'attività metabolica. Le cellule sono irradiate con luce di 627 e 470 nm per 600 minuti e dopo 48 ore viene valutata la divisione cellulare. Risulta che questa avviene secondo la seguente tabella:

	% di cellule in cui avviene la divisione cellulare
cellule di controllo	89±5 %
627 nm	91±4 %
470 nm	84±6 %

Tab. 7 Effetti sulla proliferazione cellulare a seguito di radiazione luminosa.

Infine, per esaminare gli effetti sulla morfologia, le cellule sono irradiate da luce con lunghezze d'onda di 627, 567 e 470 nm per 300 minuti. Le misure sono effettuate subito dopo in modo che la densità sia tale da non avere contatto tra le cellule. I dati così ottenuti sono confrontati con i rispettivi valori delle cellule di controllo; si considerano in particolare il rapporto d'aspetto (che è il rapporto tra lunghezza e larghezza della cellula) e il grado di simmetria rispetto alla conformazione a cerchio (circularità). In entrambi i casi non si osservano cambiamenti importanti nei valori ( $p = 0.96$  e  $p = 0.59$  rispettivamente).

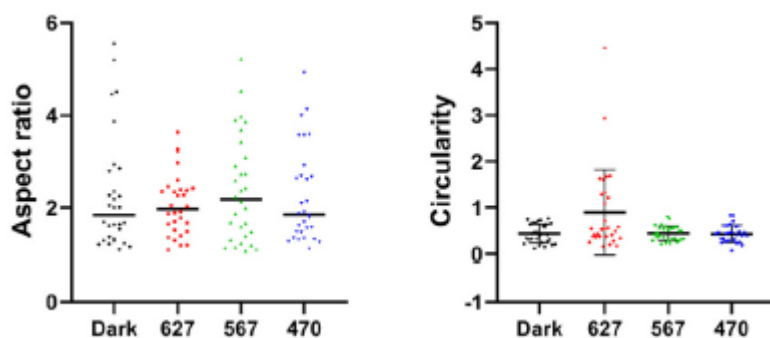


Fig. 33 Rapporto d'aspetto e circolarità in funzione della lunghezza d'onda, con riportati anche i valori ottenuti dalle cellule di controllo.

Dai risultati ottenuti si può dunque affermare che i gangli delle radici dorsali (DRG) sono più sensibili alla radiazione luminosa, sia per quanto riguarda la lunghezza d'onda che il tempo di esposizione.

In particolare si ha che per i 470 nm la crescita dei neuriti è inversamente proporzionale alla dose. Tenendo presente che non ci sono effetti rilevanti sulla sopravvivenza delle cellule coinvolte, è possibile concludere che in opportune condizioni la luce ha effetti inibitori solamente sulla crescita dei DRG.

Un risultato opposto è stato ottenuto per gli espunti di DRG, in cui sebbene la lunghezza d'onda fosse la stessa e il tempo di esposizione fosse quattro volte maggiore non si sono verificati cambiamenti degni di nota sulla crescita.

Una possibile spiegazione di questi diversi comportamenti potrebbe essere non solo la differenza nel numero di cellule coinvolte (gli espianti sono formati da migliaia di neuroni) ma anche le diverse condizioni alle quali sono state svolte le misure. Infatti i neuroni singoli sono stati irradiati subito dopo essere stati posizionati sul terreno di coltura e le misurazioni sono state eseguite dopo 24 ore. Nel caso degli espianti invece le cellule sono state irradiate un giorno dopo essere state posizionate sul terreno di coltura e i dati sono stati raccolti 72 ore dopo; gli espianti di DRG hanno quindi avuto maggior tempo per risanarsi dopo l'irradiazione.

Un ulteriore motivo sottostante questo diverso comportamento potrebbe essere la presenza negli espianti di DRG delle cellule di Schwann, che come osservato non risentono della radiazione luminosa. Tali cellule, infatti, sono in grado di fornire particolari polipeptidi, chiamati fattori neurotrofici, che favoriscono la sopravvivenza e la crescita dei neuroni, limitando così i danni dovuti alla radiazione luminosa.

Gli autori propongono un aggiuntivo fattore che potrebbe spiegare il diverso comportamento tra DRG e cellule di Schwann, le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Studi precedenti hanno infatti dimostrato che le lunghezze d'onda più corte (nel nostro caso 470 nm) possono causare un aumento di ROS all'interno della cellula e determinare la morte di fotorecettori (neuroni specializzati della retina), mentre lunghezze d'onda maggiori (nel nostro caso 567 e 627 nm) non hanno alcun effetto. Ipotizzando inoltre che i DRG siano più sensibili ai ROS rispetto alle cellule di Schwann, si spiegherebbe così il comportamento osservato con luce a 470 nm.

### 3.4 Punti quantici

Uno dei principali obiettivi quando si agisce sui neuroni, o sulle cellule in generale, è ridurre al minimo l'invasività delle procedure. A tale scopo i processi fotoelettrochimici o la presenza negli apparati di metalli pesanti tossici sono da evitare in quanto potrebbero danneggiare i tessuti.

Un metodo poco invasivo ed efficiente che non prevede interventi a livello genetico si basa ad esempio sull'uso delle correnti capacitive causate dalla radiazione luminosa. In particolare, l'apparato utilizzato dal gruppo di Onuralp Karatum<sup>[6]</sup> è costituito da fotoelettrodi aventi l'interfaccia donore-accettore formata rispettivamente da punti quantici contenenti fosforo di indio e un derivato del fullerene, l'estere metilico dell'acido fenil-C61-butirrico (PCBM).

I punti quantici sono nanostrutture in cui la dimensionalità nanometrica si esplica nelle tre dimensioni. Se formate da un semiconduttore o da più semiconduttori diversi, si osserva una modifica nell'ampiezza della banda proibita a causa degli effetti indotti dalla taglia. Di fatto il confinamento 3D genera una buca di potenziale tridimensionale, con livelli energetici discreti, che confina elettroni e lacune. I punti quantici presentano vantaggiose proprietà strutturali e optoelettroniche, come ad esempio banda proibita variabile e grande assorbanza nello spettro visibile. Sono stati considerati tre diversi punti quantici, con nucleo di fosforo di indio ma semiconduttori esterni diversi: solfuro di zinco (Fig. 34a), solfuro di zinco e ossido di zinco (Fig. 34b).

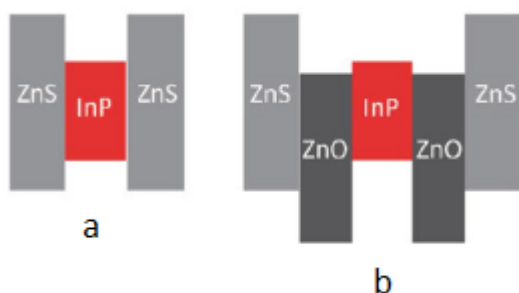


Fig. 34 Configurazioni dei punti quantici considerati con rappresentate le bande energetiche proibite.

La struttura usata prevede uno strato di ossido di zinco che consente il movimento degli elettroni e al tempo stesso blocca le lacune nelle loro posizioni grazie a un'energia di gap relativamente alta.

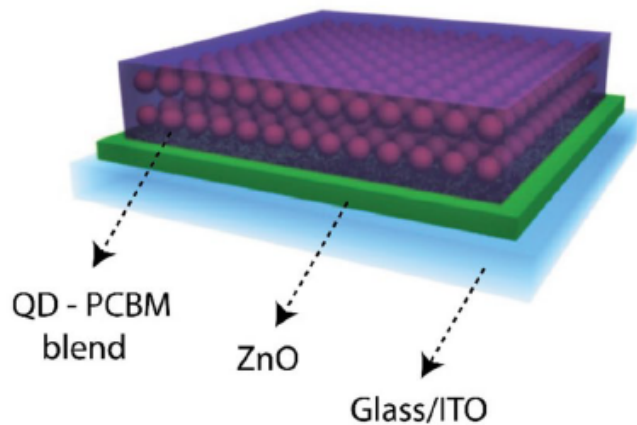


Fig. 35 Setup utilizzato nell'esperimento.  
ITO sta per ossido di indio drogato con stagno.

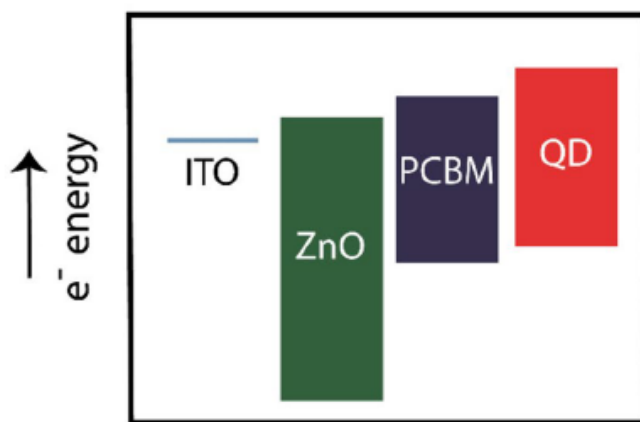


Fig. 36 Confronto tra le bande energetiche proibite dei componenti del sistema.

Il lavoro svolto si sviluppa in due parti: inizialmente uno studio delle proprietà dei punti quantici e in seguito l'analisi della risposta dell'apparato alla radiazione luminosa.

Innanzitutto sono state valutate le proprietà ottiche osservando lo spettro di assorbanza e fotoluminescenza (PL) del nucleo di fosforo di indio e dei punti quantici InP/ZnS e InP/ZnO/ZnS.

Si evince la presenza di un red shift per la terza struttura: i livelli energetici della banda di conduzione di InP e ZnO determinano infatti una eterogiunzione di tipo 2 per InP/ZnO/ZnS, e gli elettroni tendono a spostarsi nella shell dell'ossido di zinco mentre la lacuna rimane confinata nel core.

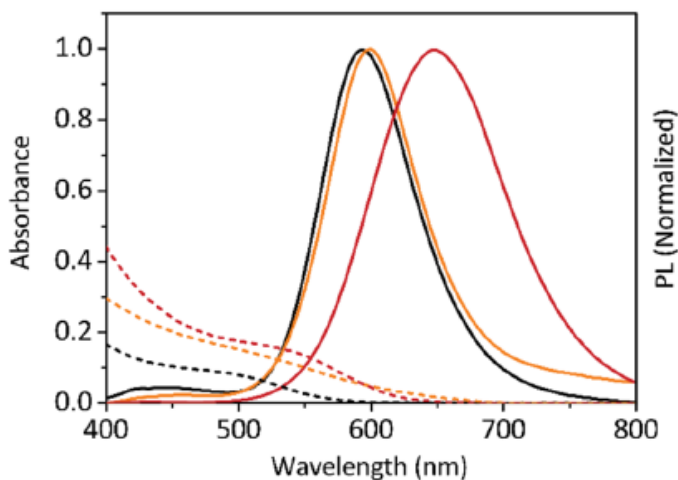


Fig. 37 Spettro di assorbanza e fotoluminescenza per il nucleo di InP (nero) e i punti quantici InP/ZnS (arancione) e InP/ZnO/ZnS (rosso).

Per ogni struttura considerata è quindi stata calcolata la resa quantica come il rapporto tra i fotoni emessi e quelli assorbiti: 7% per il nucleo di fosforo di indio, 28% per InP/ZnS e 70% per InP/ZnO/ZnS. I valori



elevati per questi ultimi indicano una avvenuta riduzione degli stati superficiali non radiativi.

Si è proseguito con lo studio delle proprietà elettroniche risolvendo le equazioni di Poisson-Schrödinger nell'approssimazione di massa efficace; sono così stati determinati ad esempio l'energia di singola particella di elettrone e lacuna, le corrispondenti funzioni d'onda radiali e le energie di legame dell'eccitone (lo stato legato di elettrone e lacuna).

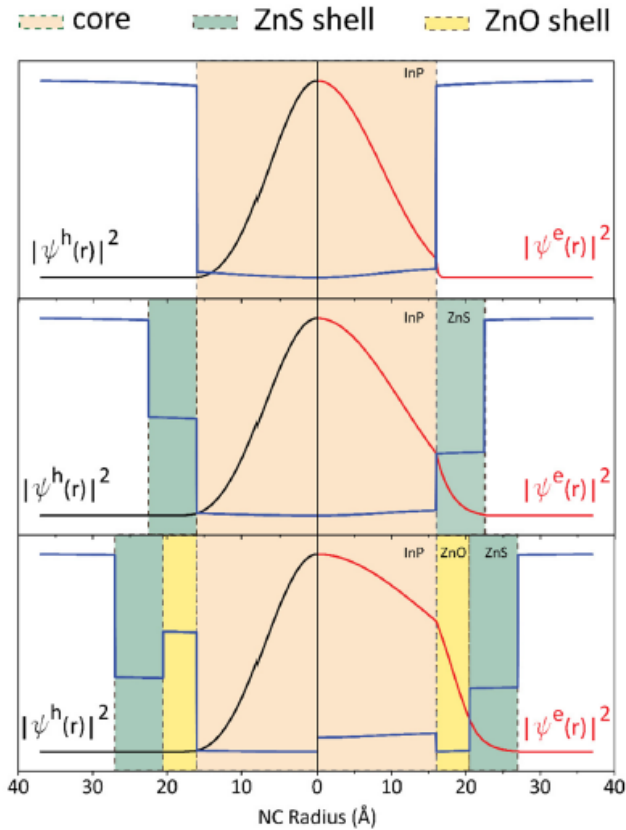


Fig. 38 Andamento del potenziale (in blu) della banda di conduzione e della banda di valenza. La leggera pendenza del potenziale è dovuta all'attrazione coulombiana tra elettrone e lacuna.

Funzioni d'onda di elettrone (rosso) e lacuna (nero) per i tre sistemi considerati.

Dall'andamento delle funzioni d'onda si osserva un diverso confinamento di elettrone e lacuna, che è dovuto all'energia di eccitone; maggiore è tale valore, più è forte l'interazione coulombiana tra elettrone e lacuna e quindi il confinamento.

Nel caso del nucleo di fosforo di indio entrambe le funzioni d'onda sono interamente confinate nel core, e in effetti l'energia di legame dell'eccitone è di circa 116 meV.

Nel punto quantico con struttura InP/ZnS invece la funzione d'onda dell'elettrone penetra nello strato di solfuro di zinco, e l'energia di legame è minore (circa 100 meV).

Infine nel punto quantico con struttura InP/ZnO/ZnS la lacuna è completamente confinata nel core, mentre la densità elettronica è non nulla in tutti gli strati (come già dedotto dalla presenza del red shift nel grafico della fotoluminescenza, Fig. 37). L'energia di legame è infatti pari a circa 88 meV. In particolare, la notevole delocalizzazione dell'elettrone indica una possibile transizione da un'eterostruttura di tipo 1 ad una di tipo 2, che è più adatta per applicazioni fotovoltaiche e dissociazione di eccitoni. Ulteriore conferma di ciò è data dall'overlap tra le funzioni d'onda di elettrone e lacuna, che nel caso del terzo punto quantico assume il valore minore, 0.52. Per le altre due strutture tale valore è invece 0.89 per il nucleo di InP e 0.76 per il punto quantico InP/ZnS.

Passando allo studio dell'apparato costituito da punto quantico e PCBM, è stata innanzitutto valutata la risposta alla radiazione luminosa. Il setup utilizzato consiste in tre elettrodi immersi in un fluido cerebrospinale artificiale (in modo da imitare il mezzo biologico) illuminati con luce pulsata fornita da un LED (Fig. 39). La stimolazione è di 10 ms e la lunghezza d'onda nominale è pari a 445 nm con irradianza di 57 mW/cm<sup>2</sup>.

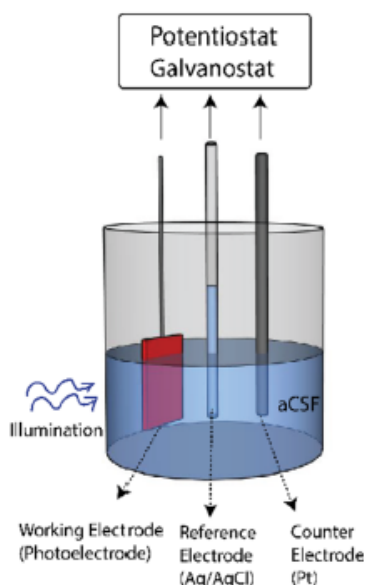


Fig. 39 Setup per lo studio della risposta alla radiazione luminosa. Il termine aCSF indica il fluido cerebrospinale artificiale.

La risposta all'illuminazione è stata analizzata non solo per due diversi tipi di punti quantici (InP/ZnS e InP/ZnO/ZnS) ma anche a valori diversi del rapporto tra i volumi occupati dal punto quantico e dal PCBM (tale rapporto è indicato con QD:PCBM).

Tenendo presente che il punto quantico è un donore e il PCBM è un accettore, si vede subito che il rapporto tra i due volumi riflette il rapporto tra numero di donori e numero di accettori. Affinché ci sia un'efficiente separazione di cariche è quindi necessario che ci sia un alto numero di accettori per ogni donore.

Partendo dalla struttura con punto quantico InP/ZnO/ZnS e osservando il grafico della densità di fotocorrente in funzione del tempo per ogni diverso rapporto QD:PCBM, si nota una diminuzione dell'ampiezza dei picchi capacitivi, che ha valore minimo nel caso 1:7.

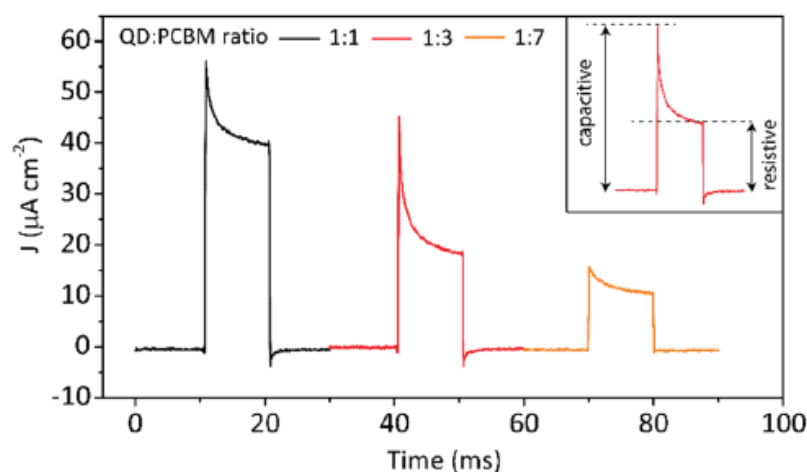


Fig. 40 Densità di fotocorrente in funzione del tempo a diversi rapporti QD:PCBM con punto quantico InP/ZnO/ZnS. I valori massimi sono rispettivamente:

1:1 → 57  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

1:3 → 45  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

1:7 → 15  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$

Andando a considerare il rapporto tra la corrente capacitiva e la corrente resistiva si ottengono i seguenti valori:

QD:PCBM	corrente capacitiva/corrente resistiva
1:1	1.43
1:3	2.50
1:7	1.47

Tab. 8 Confronto tra corrente capacitiva e corrente resistiva per diversi rapporti QD:PCBM.

È possibile affermare quindi che lo strumento con punto quantico InP/ZnO/ZnS più efficace per avere una corrente capacitiva è quello avente il rapporto QD:PCBM intermedio (1:3). In tal caso la differenza di potenziale dovuta alla radiazione luminosa è di  $46 \pm 4$  mV, un valore sufficiente per indurre un potenziale d'azione nei neuroni.

Si è quindi considerato l'apparato con punto quantico InP/ZnS e rapporto QD:PCBM 1:3 per vedere se si presenta anche in questo caso un comportamento analogo. L'andamento della fotocorrente è però molto diverso: si nota sia un profilo costante della corrente se l'intensità luminosa è essa stessa costante (e ciò rivela la predominanza di processi elettrochimici) sia una dinamica di carica/scarica più lenta (tempi di salita e discesa di 2 ms contro i 200  $\mu$ s per InP/ZnO/ZnS).

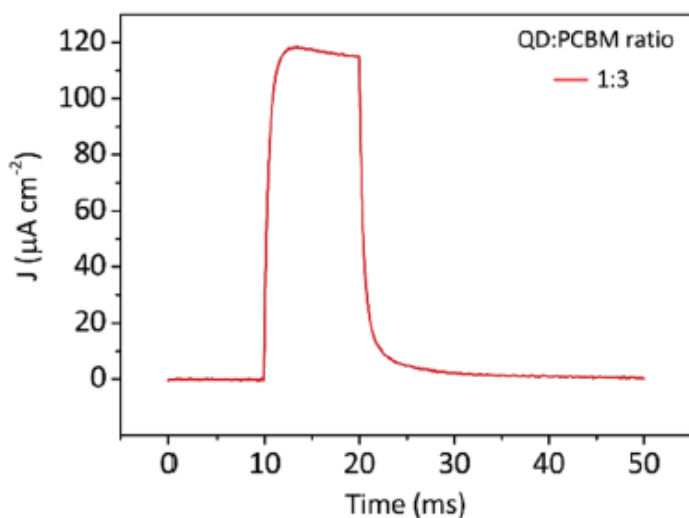


Fig. 41 Densità di fotocorrente in funzione del tempo per l'apparato con punto quantico InP/ZnS e rapporto QD:PCBM 1:3.

Il diverso comportamento mostrato dai due punti quantici InP/ZnS e InP/ZnO/ZnS si spiega prendendo in esame l'energia di legame dell'eccitone  $E_b$ ; affinché ci sia un'efficiente separazione di cariche infatti la differenza energetica tra il più basso orbitale molecolare libero (LUMO) di donore e accettore dev'essere maggiore di  $E_b$ . Dato che il punto quantico InP/ZnO/ZnS ha energia di legame dell'eccitone molto più bassa rispetto a InP/ZnS, gli apparati formati dal primo punto quantico sono molto più efficaci nella separazione delle cariche.

L'interfaccia fotoelettrodo-fotoelettrolita ha un ruolo di primo piano nel meccanismo sottostante i diversi comportamenti osservati. Quando la radiazione luminosa incide sul sistema l'energia assorbita dal punto quantico determina la formazione di una coppia elettrone-lacuna che ha una precisa energia di eccitone  $E_b$ . Anche nel PCBM si formano eccitoni, ma a causa della ridotta diffusione questi non raggiungono l'interfaccia donore-accettore e perciò non contribuiscono alla corrente capacitiva.

A differenza della lacuna, che rimane confinata nel punto quantico, l'elettrone si trasferisce nel PCBM. Considerando quindi l'interfaccia fotoelettrodo-elettrolita, e tenendo presente che è in larga parte costituita da PCBM, la barriera di potenziale presente fa sì che gli elettroni non migrino nella soluzione di fluido cerebrospinale, ma vengono catturati invece dallo strato di ossido di zinco. Di conseguenza le lacune presenti nel punto quantico inducono uno strato di elettroni nell'elettrolita, e quindi una fotocorrente capacitiva (che è una corrente di spostamento) dall'elettrodo all'elettrolita.

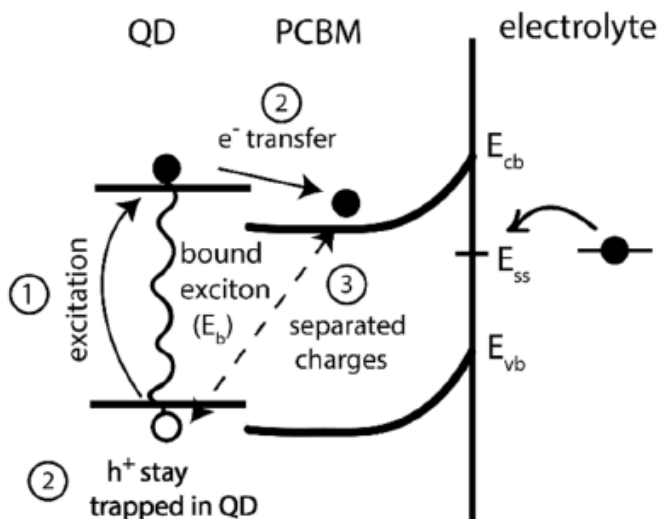


Fig. 42 Meccanismo che si realizza all'interfaccia QD:PCBM-elettrolita a seguito dell'irradiazione luminosa.

$E_{cb}$ ,  $E_{vb}$  e  $E_{ss}$  indicano rispettivamente l'energia della banda di conduzione, della banda di valenza e degli stati superficiali.

Tuttavia la presenza degli stati superficiali svolge un ruolo nel trasferimento di carica all'interfaccia e si hanno così processi fotoelettrochimici. Nel fotoelettrodo costituito dal punto quantico InP/ZnO/ZnS però tale contributo non è significativo: infatti la resa quantica è la maggiore (70 %) e il numero di stati superficiali è minore. Si può quindi affermare che il sistema costituito da PCBM e punto quantico InP/ZnO/ZnS consente di avere un'efficiente stimolazione capacitiva, con rischio di danni biologici ridotto grazie alla quasi totale assenza di processi elettrochimici.

#### 4. Conclusione

Confrontando i risultati ottenuti con i vari metodi analizzati per la stimolazione neuronale, è possibile avanzare alcune osservazioni utili per applicazioni future.

Partendo innanzitutto dalla profondità alla quale si vuole agire, il quadruplo butterfly coil (QBC) e l'array di due solenoidi con nucleo di acciaio con profilo a V permettono di avere un intenso campo elettrico in corrispondenza degli strati più esterni della corteccia cerebrale, con una buona risoluzione spaziale.

Se si vuole agire negli strati più interni invece il triple halo coil (THC) si rivela essere uno strumento adatto, sebbene per ottenere un'elevata risoluzione spaziale anche a grandi profondità l'array a cinque solenoidi è di gran lunga più conveniente.

Se uno degli obiettivi principali è agire a distanza su soggetti liberi di muoversi, l'apparato costituito da m-Torquer legato a canali ionici e CMA si presta particolarmente. Il raggio d'azione è infatti di alcune decine di centimetri e il meccanismo sottostante è di tipo meccanico (quindi per certi aspetti meno invasivo rispetto alla classica stimolazione magnetica transcranica). Gli effetti stimolanti osservati sul moto dei topi suggeriscono una possibile futura applicazione sugli esseri umani per curare malattie legate al movimento (in primis il Parkinson).

Per quanto riguarda l'intervento sui neuroni tramite radiazione luminosa, gli effetti più interessanti si hanno con la lunghezza d'onda di 470 nm; in tal caso infatti la crescita delle cellule diminuisce con l'aumentare della dose, ma allo stesso tempo non si osservano conseguenze sulla sopravvivenza delle cellule stesse. Questo approccio quindi risulta utile quando si vuole agire su neuroni malati, ad esempio tumorali: in tal caso infatti si limita la crescita delle cellule da rimuovere senza però recare danno a quelle circostanti.

Infine, un ulteriore processo poco invasivo è la stimolazione capacitiva, che non prevede un effettivo

spostamento di cariche come nelle correnti resistive. Un primo metodo consiste nell'utilizzo di array di condensatori per attivare i canali di calcio voltaggio-dipendenti, anche in modo ripetitivo.

Un metodo più innovativo consiste nell'uso di fotoelettrodi costituiti da punti quantici: con un opportuno rapporto tra il volume occupato dal punto quantico scelto e quello occupato dal derivato del fullerene è in effetti possibile avere la predominanza di correnti capacitive, e quindi la quasi totale assenza di processi fotoelettrochimici, più invasivi. In particolare il punto quantico più adatto risulta essere quello con struttura InP/ZnO/ZnS e il rapporto QD:PCBM che determina notevole corrente capacitiva è pari a 1:3.

Il presente lavoro di tesi ha dunque permesso di confrontare tra loro metodi fisici che si basano su diversi principi ed identificarne quindi i punti di debolezza e di forza. Tale lavoro è propedeutico per studiare e proporre nuovi approcci che possono sia utilizzare in toto o in parte i principi qui discussi, anche in modo sinergico, sia implementarli in configurazioni maggiormente maneggevoli e fruibili e, laddove possibile, meno invasive. Una prospettiva è quindi il coniugare quanto qui esposto con altre metodologie come la microfluidica e/o ottica e fotonica integrata in cui sia possibile stimolare i singoli neuroni oltre che il loro insieme collettivo, e identificare perciò il ruolo che il neurone ha per la sua natura fisiologica e quella indotta dalla coesistenza della relazione con altri neuroni. Tali studi giocano un ruolo primario nella comprensione di tutti i meccanismi sottostanti la stimolazione e il funzionamento del neurone in genere. Sono i punti cardini per lo sviluppo di nuove soluzioni curative oltre che diagnostiche delle malattie neuronali che ad oggi impattano notevolmente sulla società moderna perché compromettono, anche gravemente, la capacità motoria e di comprensione delle persone che, loro malgrado, si trovano ad affrontare quotidianamente gli effetti devastanti delle degenerazioni neuronali.

## 5. Bibliografia

- [1] Oluwaponmile F. Afuwape, Hiroyuki Oya et al., *Measurement and modeling of the effects of transcranial magnetic stimulation on the brain*, IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS, volume 57, n. 2, febbraio 2021, codice DOI 10.1109/TMAG.2020.3008554
- [2] Ivan C. Carmona, Deepak Kumbhare et al., *Quintuple AISI 1010 carbon steel core coil for highly focused transcranial magnetic stimulation in small animals*, AIP ADVANCES, n. 11, 2021, codice DOI 10.1063/9.0000219
- [3] Jung-uk Lee<sup>1</sup>, Wookjin Shin et al., *Non-contact long-range magnetic stimulation of mechanosensitive ion channels in freely moving animals*, NATURE MATERIALS, 2021, codice DOI 10.1038/s41563-020-00896-y
- [4] M. Giacomello, S. Girardi et al., *Stimulation of Ca<sup>2+</sup> signals in neurons by electrically coupled electrolyte-oxide-semiconductor capacitors*, JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, 2011, codice DOI 10.1016/j.jneumeth.2011.02.009
- [5] David Diaz Vera, Jonathan R. Soucy et al., *Light irradiation of peripheral nerve cells: wavelength impacts primary sensory neuron outgrowth in vitro*, JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY & PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY, volume 215, febbraio 2021, codice DOI 10.1016/j.jphotobiol.2020.112105
- [6] Onuralp Karatum, Guncem Ozgun Eren et al., *Quantum dot and electron acceptor nano-heterojunction for photo-induced capacitive charge-transfer*, SCIENTIFIC REPORTS, volume 11, n. 1, dicembre 2021, codice DOI 10.1038/s41598-021-82081-y

## 6. Fonti immagini

- Fig. 1 [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Chemical\\_synapse\\_schema\\_cropped.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Chemical_synapse_schema_cropped.jpg)
- Fig. 2 <http://webspace.ship.edu/cgboer/theneuron.html>
- Fig. 3 <https://courses.lumenlearning.com/boundless-psychology/chapter/neurons/>
- Fig. 4 Sistema di riferimento: <https://www.shutterstock.com/it/search/3d+coordinate+axis>
- Configurazione del sistema: Articolo [1], p. 2
- Fig. 5, 6, 7                      Articolo [1], p. 3
- Fig. 8, 9, 10, 11              Articolo [1], p. 4
- Fig. 12, 13                     Articolo [1], p. 5
- Fig. 14                         Articolo [2], p. 3
- Fig. 15                         Articolo [2], p. 4
- Fig. 16                         Articolo [2], p. 5
- Fig. 17                         Articolo [2], p. 6
- Fig. 18                         Articolo [2], p. 7
- Fig. 19                         Articolo [3], p. 2
- Fig. 20, 21                     Articolo [3], p. 3
- Fig. 22, 23                     Articolo [3], p. 5
- Fig. 24                         Articolo [3], p. 6
- Fig. 27                         Articolo [5], p. 2
- Fig. 28                         Articolo [5], p. 4

Fig. 29, 30	Articolo [5], p. 5
Fig. 31, 32, 33	Articolo [5], p. 6
Fig. 34, 35, 36	Articolo [6], p. 2
Fig. 37	Articolo [6], p. 3
Fig. 38	Articolo [6], p. 4
Fig. 39, 40	Articolo [6], p. 5
Fig. 41, 42	Articolo [6], p. 6